

Nachweis konzertierter elektronischer Kopplungen in Dreifarbstoffsystemen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Larissa-Natalie Bieritz

aus Wolfenbüttel

1. Referent: Prof. Dr. Peter Jomo Walla

2. Referent: Prof. Dr. Karl-Heinz Gericke

eingereicht am: 09.12.2013

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.03.2014

Druckjahr 2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	5
2.1 Die SCHRÖDINGER-Gleichung	5
2.2 FERMIs Goldene Regel	6
2.3 Absorption	7
2.3.1 Vibronische Übergänge	9
2.3.2 Elektronische Übergänge	10
2.3.3 Absorbanzmessungen	12
2.4 Verhalten elektronisch angeregter Moleküle	13
2.4.1 JABLONSKI-Diagramm	13
2.4.2 Quantenausbeute und Quenching	15
2.5 Interaktion zwischen Molekülen	17
2.5.1 Exzitonische Wechselwirkungen	17
2.5.2 Energietransferwege	24
2.5.3 Energietransfer in Mehrfarbstoffsystemen	32
2.6 DNA	36
2.6.1 Chemischer Aufbau	36
2.6.2 Räumlicher Aufbau	37
3 Wahl des Fluorophor-DNA-Systems	42
3.1 Blauer Chromophor B	43
3.2 Rote Chromophore R ₁ und R ₂	44
3.3 Allgemeine Zusammensetzung der Proben	45
3.4 Energetische Unterscheidung der Gruppen	46
3.5 Positionierung der Farbstoffe an der DNA	48
3.5.1 Verlinkung der Farbstoffe an die DNA	49
3.5.2 Korrelation zwischen Abstand und Winkel	50

4	Experimenteller Teil	56
4.1	Technische Herstellung der Proben	56
4.1.1	Hybridisierung der Proben	56
4.2	Absorbanzmessungen	57
4.3	Fluoreszenzmessungen	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Vorausgehende Untersuchungen	60
5.1.1	Absorbanzmessungen von B, R ₁ und R ₂	60
5.1.2	Emissionsmessungen von B, R ₁ und R ₂	61
5.1.3	Abgeleitete Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionswerte	63
5.1.4	Konzentrationsabgleich	64
5.2	Spektrale Effekte in Dreifarbstoffsystemen	66
5.2.1	Absorbanzspektren im Bereich der roten Farbstoffe	66
5.2.2	Theoretisch berechnete Absorbanzspektren	96
5.2.3	Absorbanzspektren im Bereich des blauen Farbstoffs	100
5.2.4	Emissionsspektren im roten Bereich	113
5.2.5	Emissionsspektren im blauen Bereich	129
6	Diskussion	133
6.1	Vorausgehende Untersuchungen	133
6.1.1	Absorbanz- und Emissionswerte von B, R ₁ und R ₂	133
6.1.2	Abgeleitete Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionswerte	134
6.1.3	Konzentrationsabgleich	135
6.2	Seitenbandeneffekt	135
6.2.1	Grundsätzliche Auffälligkeiten	136
6.2.2	Korrelation zwischen Absorbanz und Emission	141
6.2.3	Mögliche Erklärungsmodelle	143
7	Zusammenfassung und Ausblick	148
8	Literatur	152
9	Abbildungsverzeichnis	161

10 Tabellenverzeichnis	167
11 Anhang	A
11.1 Einstellungen der Messgeräte	A
11.1.1 Absorbanzspektrometer	A
11.1.2 Fluoreszenzphotospektrometer	B
11.1.3 Kombinationen	C
11.2 Zusätzliche Spektren und Informationen	D
11.2.1 Absorbanzspektren	D
11.2.2 Zusätzliche Informationen zur Erstellung der theoretisch errechneten Spektren	E
11.2.3 FRET-Messungen zwischen R_1 und R_2	G
11.3 Genehmigungen	I
12 Danksagung	L

Abkürzungsverzeichnis

*	angeregt(er Zustand)
A	Adenin (Nukleotid)
A	Akzeptor
... ₁	Akzeptor 1 (energetisch höher als A ₂)
... ₂	Akzeptor 2 (energetisch niedriger als A ₁)
a. u.	<i>arbitrary unit</i> : willkürliche Einheit
B	blauer Farbstoff (Pyren)
bp	<i>basepair</i> : Basenpaar(e)
<i>c</i>	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum = $2,998 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$
<i>c</i>	Konzentration
C	Cytosin (Nukleotid)
D	Donor
... ₁	Donor 1 (energetisch höher als D ₂)
... ₂	Donor 2 (energetisch niedriger als D ₁)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
E^-	abgesenktes neues Energieniveau
E^+	erhöhtes neues Energieniveau
ϵ_A	Extinktionskoeffizient
ET	Energietransfer
F	Farbstoff
Fl	Fluoreszenz
FRET	FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer
G	Guanin (Nukleotid)
<i>h</i>	PLANCKsches Wirkungsquantum = $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$
\hbar	reduziertes PLANCKsches Wirkungsquantum = $\frac{h}{2\pi}$
\hat{H}	HAMILTON-Operator
$\hat{H}^{(1)}$	Störoperator
HOMO	<i>Highest Occupied Molecule Orbital</i> : höchstes besetztes Molekülorbital
$I_\beta^\alpha(\gamma)$	Intensität der Probe α bei der Wellenlänge β , wenn sie mit der Wellenlänge γ angeregt wird
IC	<i>Internal conversion</i> : innere Umwandlung
IR	Infrarotstrahlung
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
<i>J</i>	Überlappungsintegral
<i>k</i>	Geschwindigkeitskonstante

κ	Orientierungsfaktor
λ	Wellenlänge in nm
<i>LUMO</i>	<i>Lowest Unoccupied Molecule Orbital</i> : niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
p	Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
π	π -Orbital
ψ, Ψ	Wellenfunktion
...i	... des <i>initial state</i> \equiv Anfangszustand
...f	... des <i>final state</i> \equiv Endzustand
...A	... des Akzeptors
...D	... des Donors
r_0	Gleichgewichtsabstand
R_0	FÖRSTER-Radius
R_1	roter Farbstoff (energetisch höher als R_2)
R_2	roter Farbstoff (energetisch niedriger als R_1)
S_0	elektronischer Grundzustand
S_1	erster elektronisch angeregter Singulett-Zustand
<i>SOMO</i>	<i>Single Occupied Molecule Orbital</i> : einzeln besetztes Molekülorbital
SR	Schwingungsrelaxation
T_1	erster elektronisch angeregter Triplett-Zustand
T	Thymin (Nukleotid)
UV	Ultraviolettstrahlung
<i>Vis</i>	<i>visible</i> : sichtbarer Bereich der elektromagnetischen Strahlung

1 Einleitung

Der FÖRSTER-Energietransfer (auch FÖRSTER-Resonanzenergietransfer, kurz FRET) ermöglicht eine kontaktlose Energieübertragung von einem Farbstoffmolekül auf ein weiteres. Dieses Prinzip wird vor allem zur genaueren Untersuchung biologischer Proben eingesetzt, wie später näher erläutert wird.

Durch elektromagnetische Strahlung wird ein Donormolekül in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt. Die Energie, die es bei der Rückkehr in den Grundzustand abgibt, kann durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen strahlungslos auf ein Akzeptormolekül übertragen werden, so dass dieses sich statt des Donors in einem angeregten Zustand befindet.

Detektierbar wird dieser Transfer zum einen durch eine Abnahme in der Donorfluoreszenz, zum anderen in der Zunahme einer vorher weniger ausgeprägten oder nicht vorhandenen Akzeptorfluoreszenz. Aus den unterschiedlichen Fluoreszenz-Lebensdauern des Donors und den Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe lassen sich Rückschlüsse auf die Transfereffizienz und somit auf die Umgebung und den Donor-Akzeptorabstand ziehen.

Insbesondere letzteres hat dafür gesorgt, dass sich FRET als „spektroskopisches Lineal“^[1,2] durchsetzen konnte: Sind bestimmte Parameter eines Farbstoffpaares im Vorfeld bekannt, so kann anhand der Intensitätsunterschiede der jeweiligen einzelnen und kombinierten Farbstoffe der Abstand dieses Paares bestimmt werden. Genutzt wird dieses Prinzip beispielsweise zur Beobachtung biologischer Prozesse, wie der Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes,^[3,4] der dynamischen Strukturänderung von Proteinen^[5–8] oder der Hybridisierung von Nukleinsäuren.^[9,10]

Es gibt mehrere Möglichkeiten ein für FRET passendes Farbstoffsystem zu entwerfen. Die einfachste und häufigste Anwendung stellt ein Zweifarbstoffsystem dar. Die maximale Entfernung zwischen beiden Farbstoffen darf hierbei nicht mehr als etwa 100 Å betragen, da sonst aufgrund einer starken Abstandsabhängigkeit kein effektiver Energietransfer mehr stattfindet. Darüber hinaus sind auch Systeme möglich, bei denen mehr als zwei Farbstoffe beteiligt sind. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, werden die Farbstoffe in bisher umgesetzten Systemen in Ring- oder Treppensystemen angeordnet.^[11–15] Sie geben ihre Energie dabei verbrückend und in konsekutiven Schritten von einem einzelnen Donor auf einen einzelnen Akzeptor weiter. Letzterer

kann dann, wie in Abbildung 1.1 A dargestellt, seinerseits wieder als Donor für einen weiteren Energietransferschritt dienen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, wie in Abbildung 1.1 B dargestellt, Energie in konsekutiven Schritten von einem einzelnen Donor entweder auf einen einzelnen Akzeptor F_2 oder auf einen einzelnen Akzeptor F_3 zu übertragen. Kann auch hier ein Farbstoff seinerseits wieder als Donor für einen weiteren Energietransferschritt dienen (hier F_1), so entsteht ein weiteres denkbares Farbstoffsystem, wie in Abbildung 1.1 C dargestellt. Ein großer Vorteil dieser "Fluorophorbrücken"^[16] bildet dabei beispielsweise die Vergrößerung des messbaren Abstandes: Kann der Akzeptor eines FRET-Paares gleichzeitig als Donor für einen weiteren Farbstoff agieren, sorgen somit zwei aufeinander folgende FRET-Paare für eine Verdopplung der messbaren Distanz. Der Abstand kann so auf maximal 200 Å vergrößert werden.

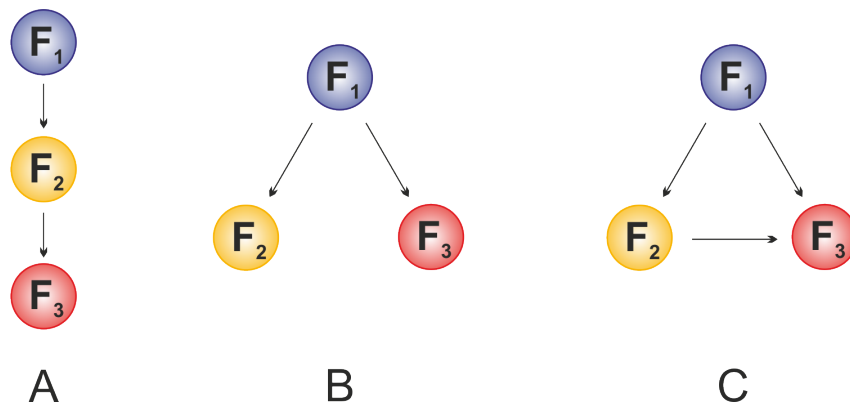


Abbildung 1.1: Übersicht verschiedener Möglichkeiten für ein Mehrfarbstoff-System.

A: Mehrstufig: F_2 dient als sowohl als Akzeptor für F_1 als auch als Donor für F_3 .

B: Gegabelt: F_1 dient als Donor für F_2 und F_3 .

C: Multipel: F_1 dient als Donor für F_2 und F_3 , F_2 zudem als Donor für F_3 .

Eine Voraussetzung all dieser gezeigten Systeme ist stets die spektrale Überlappung zwischen Donoremmission(en) und Akzeptorabsorption(en). Denkbar ist jedoch auch ein gegabelter Energietransfer, der an die Funktionsweise von *Up-* und *Downconversion* angelehnt ist und bei dem die Energie eines Donors F_1 auf zwei Akzeptoren F_2 und F_3 gleichzeitig übertragen und verteilt wird oder die Energie von zwei Donoren F_1 und F_2 gleichzeitig auf einen Akzeptor F_3 übertragen wird (siehe auch Abbildung 1.2):

Upconversion:

$$F_1^* + F_2^* + F_3 = F_1 + F_2 + F_3^* , \quad (1.1)$$

Downconversion:

$$F_3^* + F_1 + F_2 = F_3 + F_1^* + F_2^* . \quad (1.2)$$

Dabei kann es sich im einfachsten Fall um ein Dreifarbstoffsystem handeln. Unabhängig von der Transferrichtung müsste die Energie eines beispielsweise blauen Farbstoffes, genannt B, der Summe von zwei roten Farbstoffen, genannt R_1 und R_2 , entsprechen.* Die angesprochene spektrale Überlappung der Absorbanz- und Emissionsspektren von Donor und Akzeptor würde in einem solchen System durch eine Überlappung der Summenspektren von R_1 und R_2 mit dem Spektrum von B ersetzt werden.

Im Falle von *Upconversion* entspräche dabei die Summe der Emissionsenergien von R_1 und R_2 der Absorbanzenergie des Akzeptors B:

$$E_{\text{Em},R_1} + E_{\text{Em},R_2} = E_{\text{Abs},B}. \quad (1.3)$$

Bei *Downconversion* träte B als Donor auf, der seine Emissionsenergie gesplittet auf die Akzeptoren R_1 und R_2 übertragen könnte:

$$E_{\text{Em},B} = E_{\text{Abs},R_1} + E_{\text{Abs},R_2}. \quad (1.4)$$

Zur schematischen Darstellung der eben genannten Transferrichtungen werden in Abbildung 1.2 beide Prinzipien gegenübergestellt.

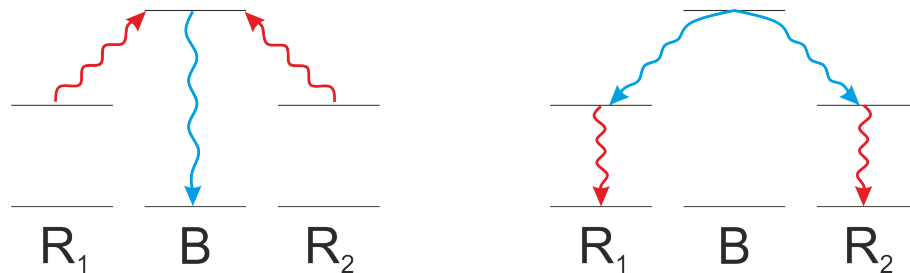


Abbildung 1.2: Schema von *Up-* und *Downconversion*.

links: *Upconversion*: Zwei elektronisch angeregte Donoren R_1 und R_2 übertragen gleichzeitig ihre Energie auf einen Akzeptor B.

rechts: *Downconversion*: Ein elektronisch angeregter Donor B überträgt seine Energie gleichzeitig auf zwei Akzeptoren R_1 und R_2 .

Keines der in Abbildung 1.2 gezeigten Dreifarbstoffsysteme ist bisher praktisch umgesetzt oder theoretisch untersucht worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu überprüfen, ob die erforderlichen elektronischen Wechselwirkungen für diese gesplittete Art von Transfer über-

* Die Bezeichnungen beziehen sich dabei auf die Lage innerhalb des sichtbaren Bereichs des elektromagnetischen Spektrums, in dem die Farbstoffe jeweils absorbieren und emittieren: B im blauen, R im roten Bereich.

haupt möglich sind. Hierzu wurden verschiedene Dreifarbstoffsysteme entwickelt und durch die Aufnahme von Absorbanz- und Emissionsspektren nach Hinweisen für eine Interaktion aller drei beteiligten Fluorophore gesucht.

Um zu untersuchen, inwiefern der Abstand der Farbstoffe untereinander und deren energetische Ähnlichkeit nach Gleichung 1.3 und 1.4 die Größe der Wechselwirkungen beeinflussen, wurden drei verschiedene Gruppen von Dreifarbstoffsystemen gewählt. Jede beinhaltet jeweils vier verschiedene Farbstoffkombinationen. In der ersten Gruppe liegen die Farbstoffe räumlich nah beieinander und stimmen energetisch nach Gleichung 1.4 und 1.3 nahezu überein. Die zweite Gruppe beinhaltet Farbstoffkombinationen, die ebenfalls energetisch ähnlich sind, aber im Verhältnis zu Gruppe I über einen mindestens doppelt so großen Abstand zueinander verfügen. In der dritten Gruppe ist der Abstand aller Farbstoffe untereinander so gering wie in Gruppe I, doch die energetischen Summen der roten Farbstoffe weichen stark von den Zuständen von B ab.

Als Trägersystem für die Farbstoffkombinationen wurde synthetische DNA verwendet, da hiermit die Abstände der einzelnen Farbstoffe gut kontrolliert und eingestellt werden können. Oligonukleotide mit präverlinkten Fluorophoren sind ein kommerziell einfach zu erwerbendes und gut untersuchtes System,^[17,18] welches ferner die zusätzliche Möglichkeit bietet, die Konzentrationen der jeweiligen Proben untereinander überwachen und vergleichen zu können.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die SCHRÖDINGER-Gleichung

Das Verhalten eines makroskopischen Systems lässt sich mit den Gesetzen der klassischen Mechanik beschreiben, Bewegung beispielsweise anhand der NEWTONschen Gesetze.^[19] Auf atomarer Ebene stoßen diese Gesetze allerdings an ihre Grenzen: Es konnte zum einen nachgewiesen werden, dass statt kontinuierlicher nur diskrete Energiezustände eingenommen werden können.^[20] Zum anderen ließ sich beobachten, dass sich Teilchen (beispielsweise Elektronen oder Protonen) wie Wellen verhalten können und Wellen (beispielsweise elektromagnetische Strahlung) Teilchencharakter aufweisen können.^[21] Die Quantelung der möglichen Energiewerte und der Welle-Teilchen-Dualismus eines Systems bilden daher die beiden wichtigsten Pfeiler der Quantenmechanik.

Zur Beschreibung dieser Systeme stellte ERWIN SCHRÖDINGER 1926 Wellenfunktionsgleichungen auf,^[22–25] die in ihrer einfachsten Form wie in Gleichung 2.1 dargestellt werden können:

$$\hat{H}\psi_n = E_n\psi_n \quad . \quad (2.1)$$

Bei der Anwendung eines Operators (hier der sogenannte HAMILTON-Operator \hat{H}) auf Eigenfunktionen des Systems (hier die Wellenfunktionen ψ_n) entstehen als Lösung Eigenwerte des Systems (hier die Energien E_n , die das System annehmen kann). Der Operator kann somit als Vermittler zwischen dem Anfangs- und dem Endzustand verstanden werden.^[26]

Die genauere Darstellung des HAMILTON-Operators (nach WILLIAM R. HAMILTON)^[27,28] führt beispielsweise zur zeitunabhängigen Form der SCHRÖDINGER-Gleichung, die hier vereinfachend lediglich in einer Raumrichtung betrachtet werden soll:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} + V(x) \right\} \psi_n(x) = E_n \psi_n(x) \quad , \quad (2.2)$$

mit $\hbar = \frac{h}{2\pi}$ = reduziertes PLANCKsches Wirkungsquantum = $1,055 \cdot 10^{-34}$ Js,

m = Masse,

$V(x)$ = potenzielle Energie (wie ψ abhängig vom Ort x).

Bei Anwendung auf stationäre Systeme werden diese als stehende Welle aufgefasst und bilden damit eine Verteilung im Raum statt einer Bewegung im selbigen. Wird Wasserstoff beispielsweise als ein stationäres System behandelt, so führen die Lösungen dieser Gleichung zu den bekannten Orbitalen, da jedes von ihnen ($1s, 2s, 2p_x, \dots$) einem möglichen Energieeigenwert entspricht.

Sich verändernde und damit zeitlich nicht stationäre Systeme werden mit der zeitabhängigen SCHRÖDINGER-Gleichung beschrieben. Hierfür wechselt die Form der Wellenfunktion von $\psi(x)$ zu $\Psi(x, t)$ und die Verwendung komplexer Zahlen wird nötig:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \Psi(x, t)}{\partial x^2} + V(x, t) \right\} \Psi(x, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(x, t)}{\partial t} . \quad (2.3)$$

2.2 FERMIS Goldene Regel

Die 1950 von ENRICO FERMI erstmals genannte^[29] Formel zur zeitabhängigen Störungstheorie für schwache Wechselwirkungen ist eine Weiterentwicklung der von PAUL DIRAC^[30] und GREGOR WENTZEL^[31] entwickelten Theorien. Sie bezieht sich auf sämtliche Übergänge, in denen ein System in seinem momentanen Zustand gestört wird und dadurch in einen neuen Zustand übergeht. Die Zeit, die es dafür benötigt, lässt sich mit folgender FERMI-Gleichung voraussagen:^[6,26,32–35]

$$k_{f \leftarrow i} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \left\langle \Psi_f \left| \hat{H}' \right| \Psi_i \right\rangle \right|^2 p_{E(\tilde{n})} . \quad (2.4)$$

$k_{f \leftarrow i}$ stellt hierbei die Übergangsrate zwischen dem Anfangszustand i (für initial) und dem Endzustand f (für final) dar und damit die Wahrscheinlichkeit des Überganges pro Zeiteinheit. „ $\frac{2\pi}{\hbar}$ “ steht für eine Form der Unschärferelation. \hat{H}' bezeichnet den HAMILTON-Operator für dieses System und beinhaltet die Summe des einfachen HAMILTON-Operators $\hat{H}^{(0)}$ und des zeitabhängigen Stör-Operators $\hat{H}^{(1)}(t)$ und somit die Störung selbst. Beim letzten Term $p_{E(\tilde{n})}$ handelt es sich um die Zustandsdichte. Sie gibt die Anzahl der Zustände von Ψ_f wieder, die dieselbe Energie besitzen wie Ψ_i und durch die Störung miteinander wechselwirken können.^[26] Je größer die Anzahl dieser Zustände, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines durch die Störung vermittelten Überganges.

Die große Bedeutung dieser Gleichung liegt in ihrer vielseitigen Anwendung, da es sich bei der Störung unter anderem um Absorption (beispielsweise von Photonen) oder spontane Prozesse (wie Photonenemission oder radioaktiver Zerfall) handeln kann.

2.3 Absorption

Trifft elektromagnetische Strahlung auf ein Molekül oder ein Atom, so können wellenlängen- und somit energieabhängig unterschiedliche Prozesse ablaufen. Liegt die absorbierte Wellenlänge im Bereich der Mikrowellenstrahlung ($\lambda \approx 1 \text{ mm} - 30 \text{ cm}$), finden im Molekül hauptsächlich Rotationsübergänge statt. Für vibronische Übergänge werden kürzere Wellenlängen im Bereich von Terahertz- und IR-Strahlung ($\lambda \approx 780 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$) benötigt. Licht (im engeren Sinne der sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums;^[36,37] $\lambda \approx 380 \text{ nm} - 780 \text{ nm}$) und UV-Strahlung ($\lambda \approx 100 \text{ nm} - 380 \text{ nm}$) rufen elektronische Übergänge hervor.

Die Beziehung zwischen Wellenlänge λ und Energie E setzt sich dabei wie folgt zusammen:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c_0}{\lambda} = h \cdot c_0 \cdot \tilde{\nu} \quad , \quad (2.5)$$

mit E = Energie [J],

h = PLANCKsches Wirkungsquantum = $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$,

ν = Frequenz [s^{-1}],

c_0 = Vakuumlichtgeschwindigkeit = $2,998 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$,

λ = Wellenlänge [m],

$\tilde{\nu}$ = Wellenzahl [m^{-1}].

Aufgrund des Welle-Teilchen-Dualismus kann der Prozess der Absorption dieser Strahlung anhand der Aufnahme eines Photons beschrieben werden. Absorbiert ein Atom oder Molekül ein Photon mit ausreichender Energie, so überträgt dieses seine Energie nach Zusammenstoß auf ein oder mehrere Elektronen. Diese gelangen hierdurch in höhere Energieniveaus.

Bezogen auf Kapitel 2.2 lässt sich Absorption auch durch die zeitabhängige Störungstheorie erklären.^[38] Zunächst wird angenommen, dass es sich bei der zugeführten Störung um die Wechselwirkung eines oszillierenden elektrischen Feldes mit einem elektrischen Dipolmoment

μ_z handelt, die zum Zeitpunkt $t = 0$ noch nicht vorliegt. Für diesen Fall kann der zuvor genannte Stör-Operator $\hat{H}^{(1)}(t)$ durch Gleichung 2.6 beschrieben werden:

$$\hat{H}^{(1)}(t) = -\vec{\mu}_z \cdot \vec{\varepsilon} \cdot \cos \omega t \quad , \quad (2.6)$$

mit ε = Amplitude des elektrischen Feldes,
 ω = Frequenz des elektrischen Feldes.

Aus der Lösung und Korrektur der zeitabhängigen SCHRÖDINGER-Gleichung (siehe Gleichung 2.3) entstehen n Korrekturterme verschiedener Ordnungen m ($\Psi_n^{(m)}$) und durch Verwendung von Linearkombinationen der jeweiligen Wellenfunktionen n Koeffizienten $c(t)$. Diese Koeffizienten dienen als Bindeglied zwischen dem genannten Stör-Operator $\hat{H}^{(1)}(t)$ und der Änderung der Besetzung $w_{f \leftarrow i}$ aus dem Übergang vom Ausgangszustand ψ_i zum Endzustand ψ_f , kurz Übergangshäufigkeit. Für eine detailliertere thematische Auseinandersetzung wird auf die bereits genannten Originalarbeiten von SCHRÖDINGER und Fachliteratur von beispielsweise ATKINS^[34,35,38] verwiesen.

Da die Matrixelemente des Stör-Operators proportional zum Koeffizienten des jeweiligen Zustandes sind und dieser zudem als Betragsquadrat proportional zu $w_{f \leftarrow i}$ ist, kann aus Gleichung 2.6 folgende Beziehung entwickelt werden:

$$w_{f \leftarrow i} \propto \left| H_{fi}^{(1)} \right|^2 \quad . \quad (2.7)$$

Da es sich bei dem Störfaktor um Absorption und somit die Wechselwirkung zwischen elektrischem Feld und Molekül handelt, muss das elektrische Dipolmoment $\vec{\mu}_z$ aus Gleichung 2.6 wie folgt definiert werden, um es dem Anfangs- und Endzustand in Abhängigkeit zum zeitlichen Verlauf der Störung (τ) anzupassen:

$$\vec{\mu}_{z,fi} = \int \psi_f^* \hat{\mu}_z \psi_i d\tau \quad . \quad (2.8)$$

Bei $\mu_{z,fi}$ handelt es sich um das Übergangsdipolmoment, welches ein Maß für die Ladungsverteilung im Verlauf des Überganges ist: Je stärker die Ladung im System umverteilt wird und

somit der entstehende Dipolcharakter ausgeprägt ist, desto größer ist die Wechselwirkung des Überganges mit Photonen und somit die Absorption selbst.

Durch Einsetzen von Gleichung 2.7 und 2.8 in Gleichung 2.6 ergibt sich letztendlich die folgende Gleichung 2.9:

$$w_{f \leftarrow i} \propto |\vec{\mu}_{z,fi}|^2 \varepsilon^2 . \quad (2.9)$$

Da es sich bei dem Kosinus-Term lediglich um einen konstanten Phasenfaktor handelt, kann dieser hier vernachlässigt werden.

Darüber hinaus ergibt sich, dass sich die Absorption der einfallenden Strahlung (in Form der Übergangshäufigkeit $w_{f \leftarrow i}$) proportional zur Intensität der Strahlung (in Form von ε^2) verhält.

2.3.1 Vibronische Übergänge

Zur Beschreibung der Schwingungsprozesse eines Moleküls wird dieses zunächst vereinfacht als harmonischer Oszillator angenommen. In diesem Modell ergibt sich für den Verlauf des Potentials eine parabelförmige Kurve. In dieser befinden sich unendliche viele, äquidistante Schwingungsniveaus, deren energetische Lage E_{vib} beschrieben werden kann durch

$$E_{\text{vib}} = \left(v + \frac{1}{2} \right) h \cdot \nu , \quad (2.10)$$

mit v = Schwingungsquantenzahl = 0, 1, 2,

Aus der SCHRÖDINGER-Gleichung können die zugehörigen Wellenfunktionen ψ dieser Zustände entwickelt werden. Diese wiederum führen quadriert als ψ^2 zu den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Moleküls. Im Grundzustand ist ψ^2 um den Gleichgewichtsabstand r_0 maximal, sodass hier die Aufenthaltswahrscheinlichkeit am größten ist. In den Schwingungsniveaus $v > 0$ wird ψ^2 hingegen an den Rändern größer, je energetisch höher sich das Niveau befindet. Dieses Auftreten entspricht den Schwingungsumkehrpunkten der klassischen Physik (vergleiche Abbildung 2.2).

In der Realität kann ein Molekül jedoch nicht unendlich Energie aufnehmen, da die Schwingung der Kerne um die Ruhelage so stark zunimmt, dass es zur Dissoziation kommt. Eine

bessere Beschreibung für reale Moleküle liefert daher das Modell des anharmonischen Oszillators. Die sich ergebende Potenzialkurve verläuft nicht mehr symmetrisch und öffnet sich mit zunehmenden Abstand der Kerne. Dadurch konvergieren die Energiedifferenzen der endlichen Schwingungsniveaus, bis sie für den dissoziierten Zustand in ein Kontinuum übergehen. Beschrieben wurde dieser nach ihm benannte Verlauf des Potentials 1929 von PHILIP MORSE^[39] (s. Abbildung 2.1).

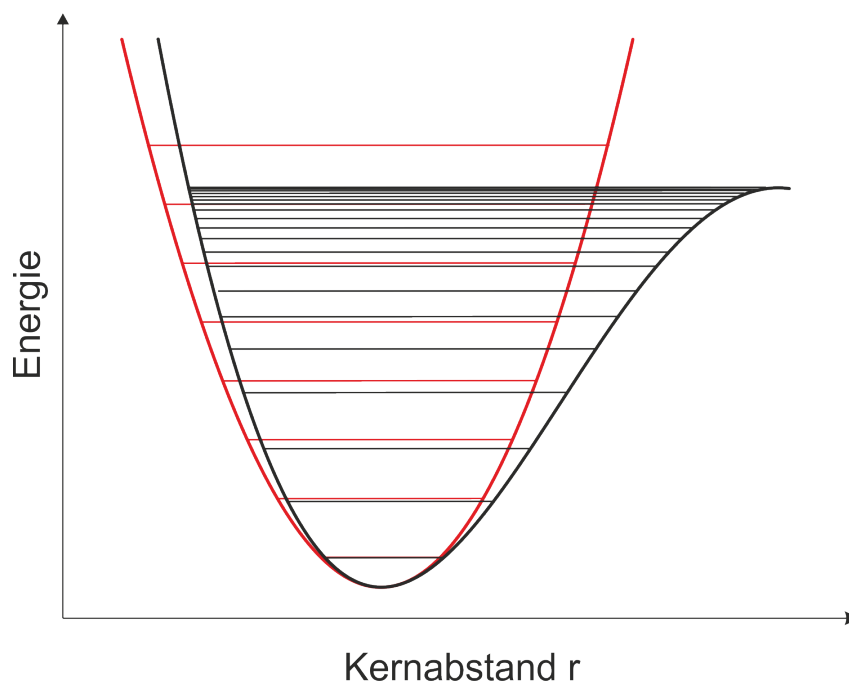


Abbildung 2.1: Unterschied zwischen den Potenzialkurven eines harmonischen (rot) und eines anharmonischen Oszillators (schwarz): Mit kleiner werdenden Abständen wird die anharmonische steiler, für größere Abstände flacher.

2.3.2 Elektronische Übergänge

Da die elektronischen Niveaus größere Abstände untereinander aufweisen als die Schwingungsniveaus, führt erst Strahlung im sichtbaren oder UV-Bereich zu elektronischen Übergängen. Sie weist eine bestimmten Frequenz ν auf und besitzt damit nach Gleichung 2.5 auch eine bestimmte Energie. Trifft sie auf ein Molekül, das durch einen temporären oder kontinuierlichen Dipolcharakter dieselbe Frequenz aufweist, findet im Molekül eine neue Ladungsverteilung statt, wodurch die Molekülorbitale neu ausgerichtet werden. Wenn das Übergangsdipolmoment (siehe Kapitel 2.3) für den Übergang in ein elektronisch höheres Niveau ungleich Null ist, so ist der Übergang erlaubt und ein Elektron kann vom Grundzustand S_0 in ein Schwingungsniveau eines elektronisch höher angeregten Niveaus S_n wechseln.

Die Zeit für die elektronische Anregung eines Moleküls aus dem Grundzustand beträgt ca. 10^{-15} s.^[40] Diese Zeitspanne ist zu kurz, um die Abstände der in Relation zu den Elektronen viel schwereren Kerne zu ändern. Die Anregung beruht demnach nur auf Elektronenübergängen und wurde beispielsweise von JAMES FRANCK und EDWARD CONDON beschrieben.^[41–43] In Abhängigkeit des Bindungsabstandes der Atome und der daraus resultierenden Verschiebung der Potenzialkurven zueinander werden dem Elektron Übergänge aus dem Grundzustand in ein Schwingungsniveau eines höheren elektronischen Zustandes ermöglicht (s. Abbildung 2.2). Da sich die Kernabstände nicht ändern, verläuft dieser Elektronenübergang vertikal und wird nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip am wahrscheinlichsten in das Niveau auftreten, das die größte Überlappung mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Grundzustandes liefert (grüner Pfeil). Dieser Übergang wird in einem Absorptionsspektrum als intensivste Bande auftreten.

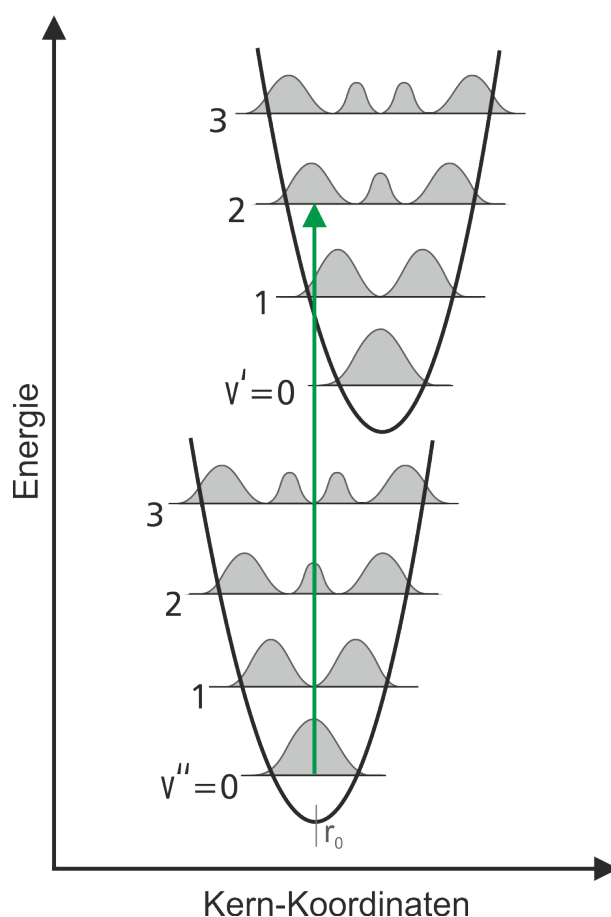


Abbildung 2.2: FRANCK-CONDON Prinzip des Elektronenüberganges aus dem Grundzustand. In grau dargestellt sind die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten Φ^2 des Moleküls in den jeweiligen Vibrationsniveaus. Der Übergang verläuft stets vertikal aus dem jeweiligen elektronischen Grundzustand. v entspricht der jeweiligen Schwingungsquantenzahl (v'' im elektronischen Grundzustand S_0 , v' im ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 .)

Für den Fall, dass das Elektron während der Anhebung aus dem Singulett-Grundzustand S_0 seinen Spin nicht ändert, verbleibt der Gesamtspin des Moleküls bei Null. Die sich daraus ableitende Spinmultiplizität von Eins ergibt wiederum Singulettzustände. Aus diesem Grund werden die jeweiligen elektronisch angeregten Energieniveaus S_1 , S_2 , etc. bezeichnet. Durch Prozesse, auf die in Kapitel 2.4.1 näher eingegangen wird, kann der Gesamtspin eines elektronisch angeregten Zustandes auch den Wert Eins annehmen, woraus sich ein Triplettzustand ergibt. Die sich daraus ergebenden Energieniveaus werden mit T_1 , T_2 , etc. gekennzeichnet.

2.3.3 Absorbanzmessungen

Wenn elektromagnetische Strahlung mit der Intensität I_0 eine Probe durchquert, können die darin befindlichen Moleküle der Konzentration c einen gewissen Anteil dieses Lichtes absorbieren, sodass hinter der Probe die abgeschwächte, transmittierte Intensität I_t messbar ist. Der Grad der exponentiellen Abschwächung ist abhängig von der Wegstrecke s des Lichtes innerhalb der Probe, der Konzentration c der jeweiligen Probe und dessen Absorbanzverhalten bei der verwendeten Wellenlänge. Beschrieben werden kann diese Abhängigkeit mit dem LAMBERT-BEERSchen-Gesetz:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot s} . \quad (2.11)$$

$\varepsilon(\lambda)$ stellt hierbei den dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten dar, der sowohl stoff- als auch wellenlängenabhängig ist und üblicherweise in der Einheit $\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ angegeben wird.

Das Verhältnis von I_t zu I_0 wird Transmission T genannt:

$$T = \frac{I_t}{I_0} . \quad (2.12)$$

Der negative dekadische Logarithmus von T und somit der Exponent in Gleichung 2.11 stellt ferner die Absorbanz dar:

$$A = -\lg T = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot s . \quad (2.13)$$

Abgrenzend dazu soll hier der Begriff Absorption das Verhalten der Elektronen auf atomarer Ebene und somit einen physikalischen Prozess bezeichnen, während Absorbanz eine Beschreibung für das phänomenologische Auftreten desselbigen darstellen soll.

Absorbanz wird in der Einheit arbitrary unit (a. u. = willkürliche Einheit) angegeben und verhält sich additiv, sofern die beteiligten Stoffe nicht miteinander in Reaktion treten.

2.4 Verhalten elektronisch angeregter Moleküle

2.4.1 JABLONSKI-Diagramm

Die Vorgänge, die nach der Absorption elektromagnetischer Strahlung innerhalb eines Moleküls ablaufen können, lassen sich anschaulich in einem JABLONSKI-Diagramm (nach ALEKSANDER JABŁOŃSKI) wie in Abbildung 2.3 beschreiben.^[44]

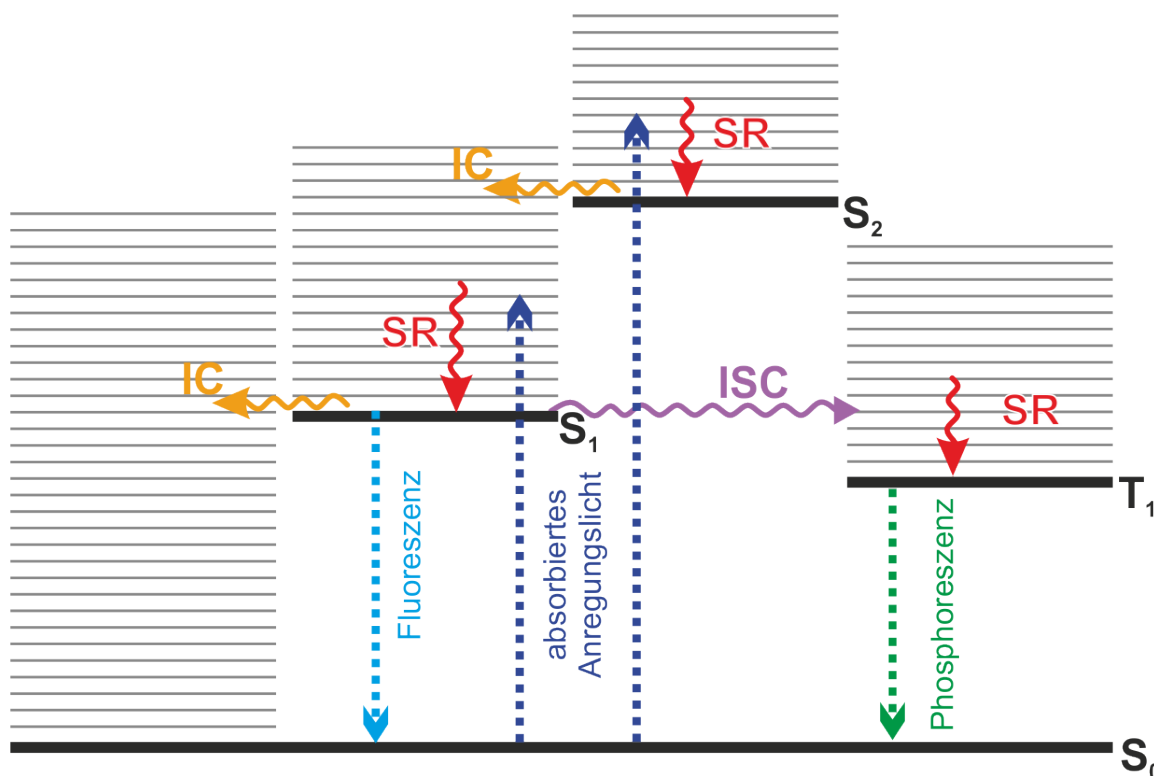


Abbildung 2.3: JABLONSKI-Diagramm. S_0 , S_1 , S_2 und T_1 bezeichnen elektronische Zustände, darüber liegen jeweils die dazugehörigen Schwingungsniveaus (aus Übersichtsgründen äquidistant) (SR: Schwingungsrelaxation; IC: Internal Conversion; ISC: Intersystem Crossing)

Es kann davon ausgegangen werden, dass sich das Elektron nach der Anhebung in ein höheres energetisch angeregtes Energieniveau im seltensten Fall direkt im Schwingungsgrundzustand dieses Zustandes befindet. Daher erfolgt zunächst eine strahlungslose Desaktivierung, beispielsweise durch Schwingungsrelaxation (SR) oder andere dissipative Prozesse. Hierbei wird solan-

ge der Anteil der Vibrationsenergie durch Kollision mit den umgebenden Solvensmolekülen als Wärme abgegeben, bis das jeweilige Schwingungsgrundniveau erreicht ist.

Da der Anteil der elektronischen Anregungsenergie jedoch nicht auf diese Weise abgebaut werden kann,^[45] sind nun weitere Prozesse möglich:

- Das Elektron gibt seine Energie als Photon ab, um in den S_0 -Zustand zu gelangen. Dieser Prozess ist folglich radiativ und wird als Fluoreszenz bezeichnet. Er erfolgt im Regelfall nur aus dem Schwingungsgrundzustand des S_1 -Niveaus (KASHAs Regel).^[46] Typische Geschwindigkeitskonstanten für diesen Prozess liegen in einem Bereich von etwa 10^{-8} s^{-1} .^[40]

Da das emittierte Photon durch oben genannte dissipative Prozesse meist eine niedrigere Energie im Verhältnis zum absorbierten Photon besitzt, ist das Fluoreszenz- zum Absorptionsmaximum bathochrom, d. h. in den längerwelligen Bereich verschoben. Dieser Effekt wird nach seinem Entdecker SIR G. G. STOKES als STOKES-Shift bezeichnet.^[47–50]

- Ein höheres Schwingungsniveau des S_0 -Zustandes ist isoenergetisch zum S_1 -Grundzustand, sodass ein direkter, strahlungsloser Übergang des Elektrons in dieses Niveau ermöglicht wird. Die überschüssige Energie kann dadurch wieder per SR abgegeben werden. Bei diesem Prozess, der auch von höher angeregten Zuständen in das S_1 -Schwingungsgrundniveau ablaufen kann, handelt es sich um die sogenannte Innere Umwandlung (*Internal Conversion, IC*). Dieser Prozess ist nur möglich zwischen Niveaus der gleichen Multiplizität und weist Geschwindigkeitskonstanten von etwa 10^{-12} s^{-1} und kürzer auf.^[40]
- Das Molekül dient als Donor und kann seine Energie auf ein Akzeptormolekül übertragen. Hierbei kann es sich um einen Transfer der Energie handeln, die das Elektron zu diesem Zeitpunkt besitzt (Energietransfer, ET) oder um das Elektron selbst (Elektronentransfer) (siehe Kapitel 2.5.2).
- Das Elektron ändert seinen Spin, sodass das Molekül strahlungslos von einem bisher Singulettzustand in einen Triplettzustand übergeht. Dieser Übergang des Elektrons vom S_1 - in ein höheres Schwingungsniveau des T_1 -Zustandes wird *Intersystem Crossing (ISC)* genannt. Dieser Prozess ist jedoch aufgrund des Drehimpulserhaltungssatzes spinverboten und tritt nur bei einer ausreichend großer Spin-Bahn-Kopplung auf.^[40] Er ist daher

unwahrscheinlicher als der $S_1 \rightarrow S_0$ -Übergang und darüber hinaus auch langsamer: Die Lebensdauer nimmt typischerweise Werte von 10^{-3} s und höher an.^[40]

Durch SR oder ähnliche Prozesse wird auch hier das Elektron seine Energie so weit abgegeben, dass es sich letztendlich im T_1 -Grundzustand befindet. Kommt es von hier zu einem direkten, radiativen Übergang ins S_0 -Niveau, wird die Emissionsstrahlung als Phosphoreszenz bezeichnet, welcher jedoch optisch verboten ist.

2.4.2 Quantenausbeute und Quenching^[32]

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, gibt es verschiedene Prozesse, die das Niveau, in das ein Elektron nach einer Anregung angehoben wurde, depopulieren können. Das Verhältnis zwischen der Anzahl abgegebener und aufgenommener Photonen wird durch die Quantenausbeute Φ ausgedrückt und lässt sich für alle beschriebenen Prozesse formulieren, die in Kapitel 2.4.1 genannt wurden. Die Summe aller radiativen (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) und nicht-radiativen Prozesse (wie *IC* und *ISC*) beträgt Eins. Beispielfhaft sei hier in Gleichung 2.14 die Fluoreszenz-Quantenausbeute Φ_{Fl} gezeigt:^[51]

$$\Phi_{\text{Fl}} = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen als Fluoreszenz}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_{\text{Fl}}}{k_{\text{Fl}} + k_{\text{IC}}^S + k_{\text{ISC}}} \quad (2.14)$$

mit k_{Fl} = Fluoreszenz-Geschwindigkeitskonstante,
 k_{IC}^S = Geschwindigkeitskonstante der inneren Umwandlung aus dem Singulett-Zustand,
 k_{ISC} = *ISC*-Geschwindigkeitskonstante.

Die Quantenausbeute Φ_{ISC} für das *Intersystem Crossing* vom Singulett- in den Triplettzustand ergibt sich analog durch Austausch der Fluoreszenz- durch die *ISC*-Geschwindigkeitskonstante im Zähler und wird für die folgende Berechnung 2.15 der Phosphoreszenz-Quantenausbeute Φ_{Ph} benötigt:^[51]

$$\Phi_{\text{Ph}} = \Phi_{\text{ISC}} \cdot \frac{k_{\text{Ph}}}{k_{\text{Ph}} + k_{\text{ISC}}^T} \quad (2.15)$$

Zu den strahlungslosen Nebenprozessen wie *IC* oder *ISC*, die die Quantenausbeute und auch die Fluoreszenz verringern, zählt auch das *Quenching*. Hierbei handelt es sich um unterschied-

liche Wechselwirkungen mit einem Quencher (beispielsweise das Lösungsmittel), wodurch ein angeregtes Molekül strahlungslos in den Grundzustand überführt wird.

Die Art der Wechselwirkung des Quencher-Moleküls mit dem Fluorophor entscheidet darüber, welche Art von Quenching vorliegt. Meist treten allerdings mehrere Effekte zugleich auf, sodass eine klare Zuordnung selten möglich ist.

Beim irreversiblen dynamischen *Quenching* (auch Kollisions-*Quenching* genannt) kommt es zu einem Zusammenstoß des Fluorophors mit dem Quencher, wobei dieser Teile oder sogar die gesamte Anregungsenergie des Fluorophors aufnimmt und als Wärme abgibt.^[52] Dieser Vorgang, der vergleichbar mit der Schwingungsrelaxation und der inneren Umwandlung ist, wird häufig durch das Lösungsmittel hervorgerufen, wenn dieses weit auseinanderliegende Schwingungsniveaus aufweist.

Bildet der Quencher mit dem Fluorophor einen Komplex, handelt es sich um reversibles statisches *Quenching* (auch Kontakt-*Quenching* genannt).^[52] Durch die strukturelle Veränderung des Fluorophors gibt das Molekül seine Energie vermehrt durch andere Prozesse ab. Die Gesamtfluoreszenzintensität nimmt daher gegenüber dem freien Fluorophor ab und das Spektrum kann einen veränderten Verlauf aufweisen.

Auf zwei spezielle Arten des Quenching wird an dieser Stelle lediglich kurz eingegangen und in den folgenden Kapiteln weiter vertieft. Dazu gehört zum einen das *Quenching* durch Energie-Transfer. Hierbei wird die Fluoreszenzintensität eines Donor-Molekül durch den Transfer von Energie an ein Akzeptor-Molekül vermindert. Eine genauere Betrachtung dieses Prozesses ist Bestandteil von Abschnitt 2.5.2. Zum anderen tritt ein spezieller Fall des *Quenchings* bei Farbstoffen auf, die an DNA gebunden sind. Da zum besseren Verständnis des Prozesses der Aufbau und die Struktur der DNA bekannt sein muss, wird die Thematik im Abschnitt 2.6 aufgegriffen und vertieft.

Die Verminderung der Quantenausbeute kann jedoch auch stattfinden, wenn die Konzentration der Fluorophore sehr hoch ist. Insbesondere organische Moleküle neigen zu diesem Verhalten, sodass sie beispielsweise in Pulverform schwach bis gar nicht fluoreszieren. Begründet ist dies durch starke Reabsorption der kurzwelligen emittierten Strahlung des angeregten Moleküls durch die Nachbarmoleküle.^[53–56]

Abzugrenzen vom *Quenching* ist dagegen das *Photobleaching* (Photobleichen), da es irreversibel ist und andere Ursachen hat. Bei diesem Prozess wird der Fluorophor durch intensive Bestrahlung zerstört, beispielsweise durch zu lange und/oder intensive Laserbestrahlung. Um diesen Vorgang zu umgehen, wird dafür anfälliges organisches Material beispielsweise mit gepulstem Licht oder Zwei-Photonenanregung bestrahlt.

2.5 Interaktion zwischen Molekülen

2.5.1 Exzitonische Wechselwirkungen

Die bisher beschriebenen Prozesse der Absorption und Emission bezogen sich auf das Verhalten einzelner Moleküle. Der Verlauf beider Prozesse kann sich jedoch ändern, wenn Moleküle räumlich nah beieinander liegen (etwa $3,5 \text{ \AA}$)^[57] und Dimere bilden, ohne dass feste Bindungen entstehen.* Das physikalische und spektroskopische Verhalten eines Dimeres ist davon abhängig, ob es sich bei der räumlichen Nähe um einen temporären oder längerfristigen Zustand handelt.

Ein Beispiel für ein kurzfristiges Ereignis stellt der Zusammenstoß zweier Monomere in Lösung dar.^[26] Hierbei ist für eine Dimerbildung entscheidend, ob sich die Monomere im Grundzustand oder elektronisch angeregten Zustand befinden. Beide Fälle lassen sich anhand der Molekülorbital-Theorie nach FRIEDRICH HUND und ROBERT S. MULLIKEN beschreiben.^[59–66] Kommt es zu einer Kollision zweier Monomere im Grundzustand, so reichen die entstehenden Wechselwirkungen nicht aus um eine dauerhafte Bindung zu ermöglichen: Die Wechselwirkung der voll besetzten $HOMO^\dagger$ beider Moleküle führt zu jeweils voll besetzten bindenden und antibindenden Orbitalen (siehe Schema A in Abbildung 2.4), die Gesamtstabilisierungsenergie ist dadurch Null.^[26] Liegt eines der Monomere dagegen im angeregten Zustand vor (im Schema B der Abbildung 2.4 dargestellt durch M^*), so gelingt im Vergleich zum vorher beschriebenen Fall eine günstigere Besetzung der neuen Zustände: Das angeregte Monomer weist nun zwei $SOMO^\ddagger$ auf, die neben dem $HOMO$ des zweiten Monomers N nun auch mit dessen $LUMO^\S$ in Resonanz

* Es existiert auch der Begriff *physical dimer*, um von *chemical dimers* und somit kovalent gebundenen Dimeren zu unterscheiden.^[58] In dieser Arbeit ist die letztgenannte Variante jedoch nicht Gegenstand der Betrachtung, weshalb es sich bei dem Begriff Dimer stets um die nicht kovalent gebundene Art handelt. [†] $HOMO$: höchstes besetztes Orbital, von *highest occupied molecule orbital* [‡] $SOMO$: einzeln besetztes Orbital, von *single occupied molecule orbitals* [§] $LUMO$: das niedrigste unbesetzte Orbital, von *lowest unoccupied molecule orbital*

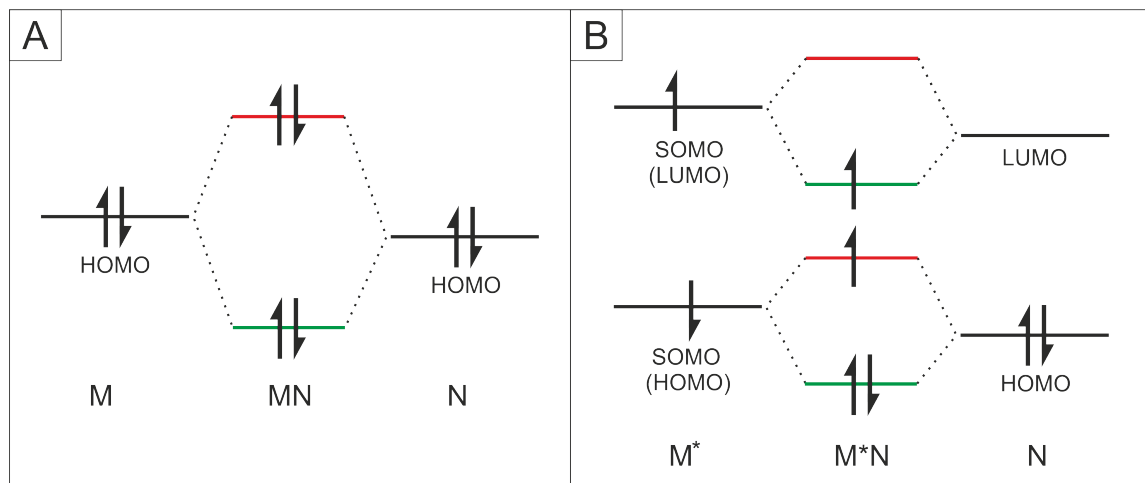


Abbildung 2.4: MO-Schema der Wechselwirkung zweier Monomere M und N bei temporärer Nähe. **A:** Beide Monomere liegen bei der Kollision o. ä. im Grundzustand vor. **B:** M wurde bereits vor der Kollision angeregt.

treten können. Die neu entstehenden bindenden und anti-bindenden Orbitale werden dabei so besetzt, dass sich drei Elektronen in stabilisierenden Orbitalen befinden und nur eines in einem destabilisierenden. Das Dimer ist damit insgesamt stabil und wird je nach Zusammensetzung unterschiedlich genannt: Entsteht es aus zwei gleichen Monomeren, so wird es als *Excimer* (von *excited dimer*) bezeichnet.^[67,68] Wird es aus zwei unterschiedliche Monomeren gebildet, wird der Begriff *Exciplex* (von *excited complex*) verwendet.^[26,69]

Excimere und Exciplexe existieren aufgrund der genannten Besetzungszustände nur im angeregten Zustand; im Grundzustand liegen sie dissoziiert vor.^[67] Dadurch ändert sich das Absorptionsverhalten gegenüber den einzelnen Monomeren nicht. Allerdings können Excimere und -plexe in der Lage sein, im angeregten Zustand ein Photon abzugeben, welches eine zu den Einzelmolekülen verschobene Emissionswellenlänge aufweist.^[26]

Ein gegensätzliches Verhalten weisen Dimere auf, die zwar durch feste Strukturen dauerhaft eine geringe räumliche Nähe zueinander, aber keine elektronischen Orbitalüberlappung aufweisen. Ein Beispiel ist eine Bindung zweier Monomere durch ein verbrückendes Molekül. Die stattfindenden Prozesse können durch das molekulare Exzitonen-Modell nach KASHA beschrieben werden,^[70–72] welches HOIJTINK darüber hinaus auf Excimere anwenden konnte.^[73]

Die Dimere werden durch den geringen Abstand bereits im Grundzustand durch VAN-DER-WAALS-Kräfte stabilisiert, was als Störung im Sinne von Kapitel 2.2 aufgefasst werden kann. Mithilfe der SCHRÖDINGER-Gleichung lässt sich daher für die Energie des Grundzustandes des

Dimers E_G folgende Gleichung 2.16 formulieren:^[74]

$$E_G = E_M + E_N + \int \int \psi_M \psi_N (V_{MN}) \psi_M \psi_N d\tau_M d\tau_N , \quad (2.16)$$

mit E_M = Energie des Monomers M im Grundzustand,
 E_N = Energie des Monomers N im Grundzustand,
 ψ_M = Wellenfunktion des Monomers M im Grundzustand,
 ψ_N = Wellenfunktion des Monomers N im Grundzustand,
 V_{MN} = VAN-DER-WAALS-Kopplungsterm.

Zusätzlich können die Niveaus der angeregten Zustände der Monomere in Resonanz treten und aufgesplittet werden. Für den Fall, dass nur eins der beiden Monomere angeregt wird (in diesem Beispiel M^*), lässt sich für die Energie des gemeinsamen angeregten Zustandes E_A die Gleichung 2.17[†] formulieren:^[74]

$$E_A = E_M^* + E_N + \int \int \psi_M^* \psi_N (V_{MN}) \psi_M^* \psi_N d\tau_M d\tau_N \pm \int \int \psi_M^* \psi_N (V_{MN}) \psi_M \psi_N^* d\tau_M d\tau_N . \quad (2.17)$$

Zur Vereinfachung können zunächst die ersten beiden Summanden zu einem Term der Einzel-elemente E_{EE} zusammengefasst werden. Der dritte Summand stellt wiederum den VAN-DER-WAALS-Kopplungsterm dar, nun aber für den gemeinsamen angeregten Grundzustand. Er kann mit D bezeichnet werden. Der letzte Term gibt die Größe des Resonanzsplittings wieder und beinhaltet in einer elektrostatischen Betrachtung des Überganges vom Grundzustand in den angeregten Zustand auch die Übergangsdipolmomente der einzelnen Monomere.^[74]

Durch das Vorzeichen \pm wird deutlich, dass zwei neue Niveaus entstehen: eines über dem ursprünglichen gemeinsamen (E''), eines darunter (E'). Die Größe des Unterschiedes dieser beiden Niveaus wird als Resonanzsplittingterm bezeichnet und hier als Ξ dargestellt. Für die Übergangsenergie des Komposit-Moleküls lässt sich vereinfacht die Gleichung 2.18 formulieren,^[74] welche den Unterschied zwischen Gleichung 2.17 und 2.16 darstellt:

$$\Delta E_{\text{Komposit}} = \Delta E_{EE} + \Delta D \pm \Xi . \quad (2.18)$$

[†] die Angaben mit Stern beziehen sich jeweils auf die angeregten Zustände

Als grobes Schema spiegelt Abbildung 2.5 die angeregten Zustände von M und N, die Absenkung des gemeinsamen Niveaus durch die VAN-DER-WAALS-Kopplung ΔD und die Aufspaltung dieses gemeinsamen Niveaus um Ξ wider:

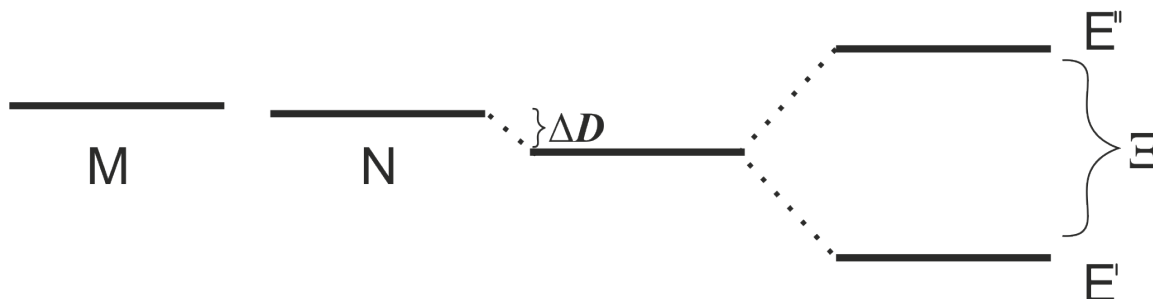


Abbildung 2.5: Darstellung der angeregten Energieniveaus zweier Monomere M und N und die Entstehung von Exzitonenzuständen nach Bildung eines Dimers. Durch VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen wird ein gemeinsames Niveau der beiden Monomere bereits leicht abgesenkt und durch ein Resonanzsplitting letztendlich aufgespalten in die Niveaus E' und E'' .

Die Bildung solcher Dimere hat im Gegensatz zu den vorher besprochenen Excimeren und -plexen nicht nur Auswirkungen auf ein resultierendes Fluoreszenzspektrum, sondern bereits auf die Absorbanzspektren. Zum einen hängt die Größe von Ξ als elektronischer Kopplungsterm vom Abstand und der Oszillatorstärke der Monomere ab. Typische Aufspaltungswerte liegen im Bereich von $1000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$.^[74] Zum anderen kommt es je nach Orientierung der Übergangsdipolmomente beider Monomere zueinander zu neuen Übergängen aus dem S_0 -Grundzustand (s. Abbildung 2.6).

Zunächst muss beachtet werden, ob zwischen den Übergangsdipolmomenten attraktive oder repulsive Wechselwirkungen herrschen: Erstere führen zu E' , letztere zu E'' . Der Übergang wird nun in das Niveau stattfinden, in dem die Orientierung der Dipole eine Vektorsumme erzeugt, wodurch nur in-Phase-Anordnungen in Betracht kommen (s. auch Gleichung 2.8). Der Übergang in das jeweils andere aufgespaltene Niveau erzeugt kein Übergangsdipolmoment und ist daher optisch verboten. Die Fluoreszenz wird gequenchet,^[74] da weniger aus dem Grundzustand des ersten angeregten Zustandes emittiert werden wird, sondern ein großer Teil vom E'' -Zustand durch nicht-radiative Prozesse in den E' -Zustand übergehen wird, von wo Emission jedoch wiederum optisch verboten ist. Die Energie wird daher auch von hier nicht-radiativ abgebaut werden.

Eine sogenannte *head-to-tail*-Anordnung (Schema B in Abbildung 2.6) sorgt beispielsweise für eine hauptsächliche Bevölkung des E' -Niveaus und somit für einen bathochromen *Shift* (Rot-

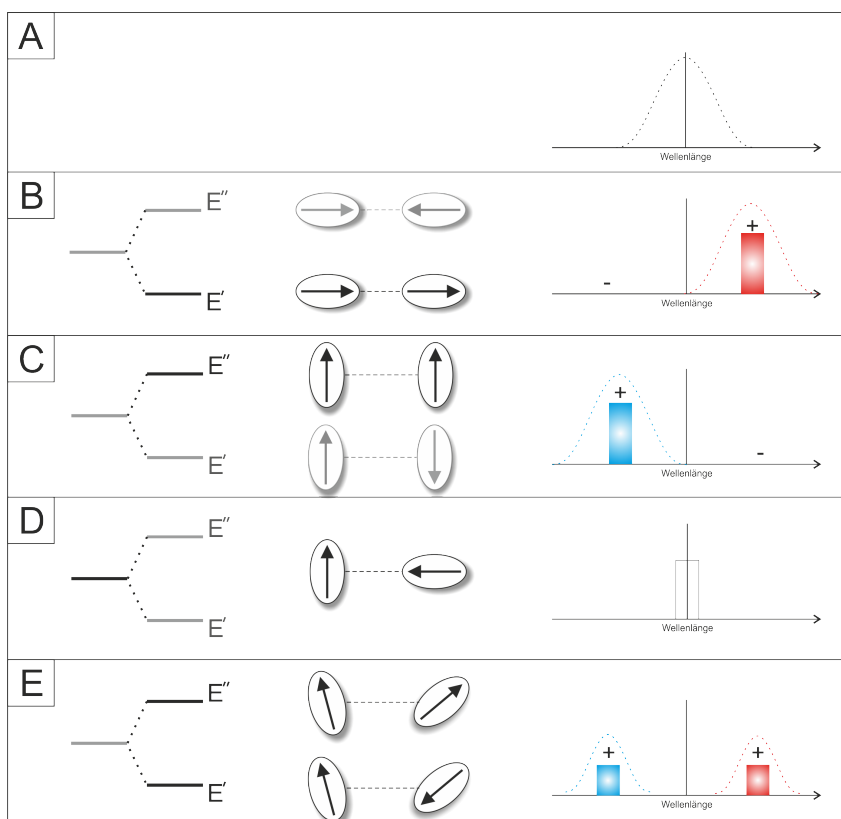


Abbildung 2.6: Darstellung der aufgesplitteten Zustände (links), der möglichen unterschiedlichen Orientierungen der Übergangsdipolmomente zueinander (mittig) und ihre Auswirkungen auf die Absorbanzspektren (rechts). **A:** willkürliches Spektrum beider Monomere vor einer Anregung. **B:** Eine lineare Anordnung führt zu einem bathochromen *Shift*. **C:** Eine parallele Anordnung führt zu einem hypsochromen *Shift*. **D:** In orthogonaler Anordnung ist ein Übergang optisch verboten. **E:** Eine schräge Anordnung sorgt für unterschiedliche Besetzungen der Niveaus und damit sowohl für einen batho- als auch hypsochromen *Shift*.^[5,32,74]

verschiebung) des ursprünglichen Spektrums. Die parallele Anordnung (Schema C in Abbildung 2.6) begünstigt das E'' -Niveau und somit eine hypsochrome, also bläuliche Verschiebung. Bei einer orthogonalen Anordnung der Übergangsdipolmomente zueinander (Schema D in Abbildung 2.6) kann es zu keiner Wechselwirkungen zwischen den Monomeren kommen, sodass keine Aufspaltung erfolgt und das Spektrum letztendlich unverändert zum Summenspektrum der Monomere bleibt. Liegen die Vektoren der Übergangsdipolmomente jedoch schräg zueinander, das heißt in einem Winkel zwischen 0° und 90° wie in Schema E der Abbildung 2.6, so variiert je nach Winkel auch die Bevölkerung der jeweiligen Niveaus und damit das resultierende Spektrum. Es handelt sich somit um Übergänge zwischen den Spektren von Schema B und C der Abbildung 2.6.^[74]

Ein Beispiel für letztgenannte Anordnung zeigen SEIBT *et al.*:^[75] Sie vergleichen experimentell erhaltene Spektren von Perylene-Bisimiden mit theoretisch berechneten und ziehen Vergleiche zwischen Monomer, Dimer und Trimer (s. Abbildung 2.7). Der Orientierungswinkel zwischen allen Übergangsdipolmomenten wurde bei den Berechnungen konstant bei 55° gehalten und die Kopplungsstärke auf $J = 0.108 \text{ eV}$ festgelegt, da hier die größte Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Daten vorlag.

Die obere Abbildung zeigt den Vergleich der theoretisch und experimentell bestimmten Monomere. Der Verlauf ist ähnlich, allerdings unterscheiden sich die Spektren in der Ausprägung

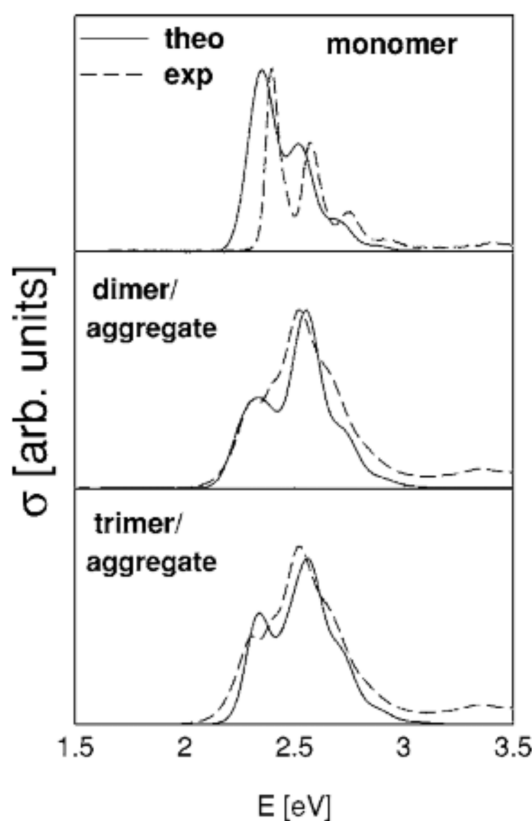


Abbildung 2.7: Die Veränderung der Absorbanzspektren nach Dimer- und Trimerbildung gleicher Monomere. Dargestellt sind jeweils die theoretisch (durchgezogene Linie) und experimentell (gestrichelte Linie) erhaltenen Werte.^[75]

und Lage der einzelnen Banden. So ist das experimentelle etwa $0,1 \text{ eV}$ bathochrom verschoben. Dies ist auf die verwendete Berechnungsmethode zurückzuführen, die nicht alle experimentellen Umstände der Proben berücksichtigen kann.

Eine starke Veränderung dieser Spektren ergibt sich bei Hinzufügen eines weiteren Monomers: Der Zentralpeak wird verstärkt, der bathochromste und vormals intensivste Peak verliert an Intensität. Die Banden des Dimers sind im theoretisch bestimmten Spektrum stärker ausgeprägt.

Die Hinzunahme eines dritten Monomers hingegen sorgt für keine signifikante Veränderung der Spektren gegenüber der des Dimers.

Dieses Beispiel macht jedoch deutlich, dass sich die beschriebenen Prozesse prinzipiell auch auf mehr als zwei Monomere übertragen lassen: Eine Beteiligung von drei oder mehr Molekülen führt zu einer Bildung von Tri- oder Oligomeren. Die Aufspaltung wird zu derselben Anzahl von exzitonischen Zuständen führen wie Monomere vorhanden sind,^[5,74] was wiederum zu derselben Anzahl an Absorptionspeaks führt.^[75]

Ein weiteres Beispiel für Spektrenveränderungen durch Dimerbildung zeigt die Arbeit von BOLLMANN *et al.*^[76] Hierbei wurde die Veränderung der Monomerabsorbanz eines Oxazin-Farbstoffes untersucht, wenn dessen Konzentration und damit die Wahrscheinlichkeit einer Dimerbildung erhöht wird.

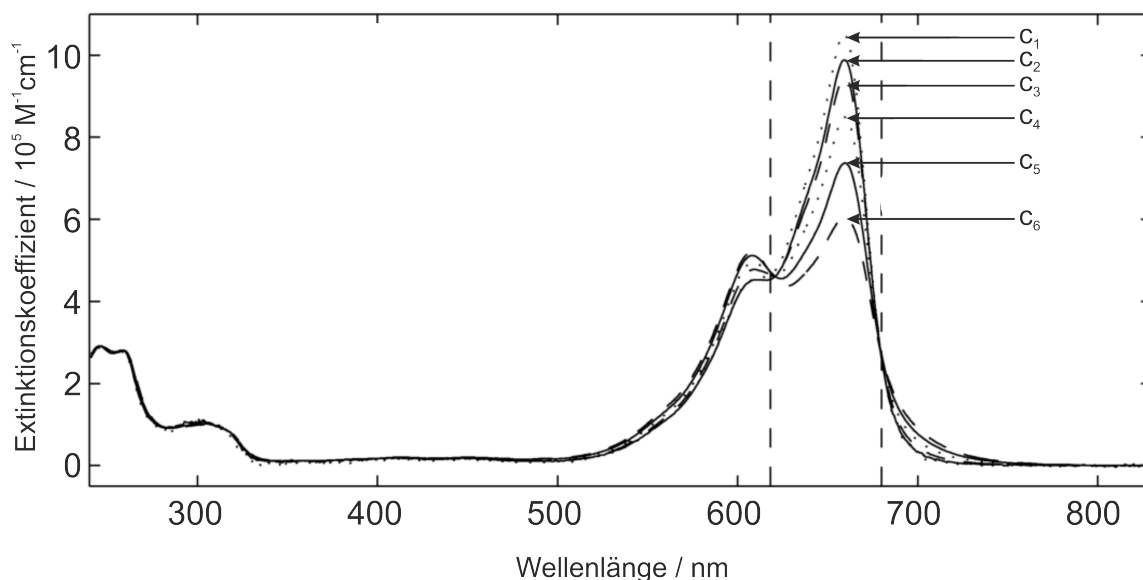


Abbildung 2.8: Konzentrationsabhängige Absorptionsspektren des von BOLLMANN *et al.* verwendeten Oxazin-Farbstoffmonomers. Mit zunehmender Konzentration des Monomers ($c_1 < c_2 < c_3 < c_4 < c_5 < c_6$) kommt es zu einer stärkeren Dimerbildung und somit zur Entstehung zweier isosbestischen Punkte bei etwa 618 nm und 680 nm.^{frei nach [76]} Das lokale Absorbanzmaximum unter 350 nm unterliegt keiner spektralen Veränderung, ebenso das Emissionsspektrum (nicht abgebildet).

2.5.2 Energietransferwege

Die Übertragung von Energie benötigt im einfachsten Fall ein Donormolekül D, das im angeregten Zustand D^* Energie abgeben kann, und ein Akzeptormolekül A, das in der Lage ist, diese Energie aufzunehmen. Dabei kann es sich bei den Molekülen um gebundene Farbstoffe handeln, aber auch um Excimere.^[57]

Grundsätzlich lassen sich die Wege, um Energie zwischen Molekülen zu übertragen, in zwei verschiedene Prozesse unterteilen: den sogenannte trivialen und nicht-trivialen Prozess. Sie unterscheiden sich in ihren Abhängigkeiten von den folgenden Faktoren:

- der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_D des angeregten Donors D^* (s. Gleichung 2.14),
- der Konzentration c des Akzeptors A,
- dem dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_A des Akzeptors, berechenbar aus dem LAMBERT-BEERSchen-Gesetz 2.11,
- dem spektralen Überlappungsintegral J der Donoremision und Akzeptorabsorbanz. Dieses ist umso größer, je mehr sich die Absorbanzkurve (hierbei gleichzusetzen mit ϵ_A) des Akzeptors und die (flächennormalisierte) Emissionskurve F_D des angeregten Donors überschneiden, welches sich auch aus der folgenden Gleichung 2.19^[40,51] ergibt:

$$J = \int_0^\infty F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad . \quad (2.19)$$

Das bedeutet, dass das Überlappungsintegral den Wert $J=1 \frac{\text{cm}^6}{\text{mol}}$ annehmen würde, wenn eine komplette Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und des Absorbanzspektrums des Akzeptors vorläge.

Je größer die Werte der genannten Parameter sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des trivialen, bzw. radiativen Weges des Energietransfers: eine Fluoreszenz-Quantenausbeute des Donors nahe Eins, eine hohe Konzentration und Lichtabsorptionsfähigkeit des Akzeptors sowie ein großes Überlappungsintegral J . Bei diesem Prozess emittiert der Donor ein Photon, welches direkt anschließend vom Akzeptor reabsorbiert wird.

Der nicht-triviale Weg unterscheidet sich davon in einem wesentlichen Punkt: Es findet keine Emission und Reabsorption eines Photons statt, sondern ein nicht-radiativer und konzer-

tierter Prozess, der sich in zwei verschiedene Kategorien unterteilen lässt: Der DEXTER-Energietransfer (DET) beruht auf Kollisionswechselwirkungen, verbunden mit dem Austausch eines Elektrons,^[6] der FÖRSTER-Energietransfer (FRET) dagegen auf COULOMBSchen Wechselwirkungen.^[77]

Ihr dennoch ähnlicher Charakter lässt sich in einer spezifischen Form der FERMI-Gleichung darstellen:^[78]

$$k_{\text{ET}} = \frac{2\pi}{\hbar} \cdot V_{\text{DA}}^2 \cdot J_{\text{DA}} \quad , \quad (2.20)$$

mit k_{ET} = Energietransferrate,
 V_{DA} = elektronische Kopplung zwischen D und A (verschieden für FRET/DET),
 J_{DA} = Überlappungsintegral zwischen Emission von D und Absorbanz von A.

Im Vergleich zu Gleichung 2.4 ersetzt der Kopplungsterm V_{DA} den Stör-Operator \hat{H}' und das Überlappungsintegral J_{DA} die Zustandsdichte p_{E} .

Darüber hinaus lassen sich beide Prozesse auf sehr ähnliche Art und Weise aus der FERMI-Gleichung herleiten:^[6] Im Falle eines Energietransfers wechseln die Terme von Ψ_i^* , wenn sich der Donor im angeregten Zustand ψ_{D}^* und der Akzeptor im Grundzustand ψ_{A} befindet, zu Ψ_{f} , wenn sich der Donor im Grundzustand ψ_{D} befindet und der Akzeptor im angeregten Zustand ψ_{A}^* . Solange Ψ_i^* und Ψ_{f} dabei die gleiche Energie haben, kann Gleichung 2.4 für die Transferwahrscheinlichkeit $k_{f \leftarrow i}$, die hier zur besseren Unterscheidung der Energietransferrate aus Gleichung 2.20 der Bezeichnung P_{DA} von DEXTER^[6] angepasst wird, zwischen Donor und Akzeptor umgeschrieben werden in^[6]

$$P_{\text{DA}} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \left\langle \Psi_{\text{f}} \left| \hat{H}' \right| \Psi_i^* \right\rangle \right|^2 p_{\text{E}(f)} \quad . \quad (2.21)$$

Da aufgrund von Nebenprozessen weder die Start- noch Endniveaus genau definiert sind, können die Wellenfunktionen auf eine für Kontinuums-Wellenfunktion übliche Energieskala normalisiert,^[6,56,77,79,80] sowie durch die Einführung von Normalisierungsfaktoren der Term für die Zustandsdichte p_{E} weggelassen werden. Diese Normalisierungen ermöglichen eine Einführung der Wahrscheinlichkeitsfunktionen p_{D}^* und p_{A} , die die jeweiligen Startzustände des Donors (im angeregten Zustand w_{D}^*) und Akzeptors (im Grundzustand w_{A}) beschreiben:^[6]

$$\int |\psi_D^*(w_{D^*})|^2 d\tau = \int |\psi_A(w_A)|^2 d\tau = 1 , \quad (2.22)$$

$$\int_0^\infty p_D^*(w_{D^*}) dw_{D^*} = \int_0^\infty p_A(w_A) dw_A = 1 . \quad (2.23)$$

Der Endzustand dagegen wird auf folgende Werte normalisiert:

$$\frac{1}{\Delta w} \int_w^{w+\Delta w} \left(\int |\psi_D(w_D)|^2 d\tau \right) dw_D = 1 , \quad (2.24)$$

$$\frac{1}{\Delta w} \int_w^{w+\Delta w} \left(\int |\psi_A^*(w_{A^*})|^2 d\tau \right) dw_{A^*} = 1 . \quad (2.25)$$

Abschließend können die asymmetrischen Start- und Endzustands-Wellenfunktionen für Donor und Akzeptor wie folgt beschrieben werden:^[6]

$$\Psi_i(w_{D^*}, w_A) = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_D^*(r_1, w_{D^*}) \psi_A(r_2, w_A) - \psi_D^*(r_2, w_{D^*}) \psi_A(r_1, w_A)] . \quad (2.26)$$

$$\Psi_f(w_D, w_{A^*}) = \frac{1}{\sqrt{2}} [\psi_D(r_1, w_D) \psi_A^*(r_2, w_{A^*}) - \psi_D(r_2, w_D) \psi_A^*(r_1, w_{A^*})] , \quad (2.27)$$

Dabei gilt zu beachten, dass diese Gleichungen lediglich bei einer Beteiligung von nur zwei Molekülen gelten und für den späteren Abschnitt 2.5.3, in dem Mehrfarbstoffsysteme beschrieben werden, umformuliert werden müssen.

2.5.2.1 FÖRSTER-Energietransfer

Dass Energietransfer auch ohne direkten Kontakt der beteiligten Moleküle durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen stattfinden kann, konnte bereits durch JEAN BAPTISTE PERRIN um 1920 beobachtet^[81,82] und um 1930 von FRANCIS PERRIN quantenmechanisch beschrieben^[83] werden. THEODOR FÖRSTER entwickelte diese Theorie weiter und erstellte als erster ein Modell dieses kontaktfreien Transfers.^[77] Ihm zu Ehren wird diese Art des Energietransfers auch FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer, kurz FRET, genannt.^[51] Die alternative Formulierung Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer bezieht sich auf den am Ende fluoreszierenden Akzeptor. Da es sich bei diesem jedoch auch um einen nicht-fluoreszierenden Quencher handeln kann und zudem

der Transfer selber nicht-radiativ abläuft, ist diese Bezeichnung missverständlich und wird in dieser Arbeit nicht weiter verwendet.

Bei einem FRET kann der Donor als klassischer oszillierender Dipol aufgefasst werden, wodurch er imstande ist, in benachbarten Molekülen ebenfalls einen Dipol zu induzieren. Sind die Übergangsdipolmomente des Donors und des Akzeptors im richtigen Winkel zueinander orientiert und die Dipolschwingungsfrequenzen und Multiplizität gleich, so findet eine Kopplung und damit der eigentliche Energietransfer in einem konzertierten Schritt statt.^[40,51,84] Das Elektron des Donors im angeregten Zustand kehrt zurück in den Grundzustand, während ein Elektron des Akzeptors vom Grundzustand in ein höheres Niveau übergeht (s. Abbildung 2.9).

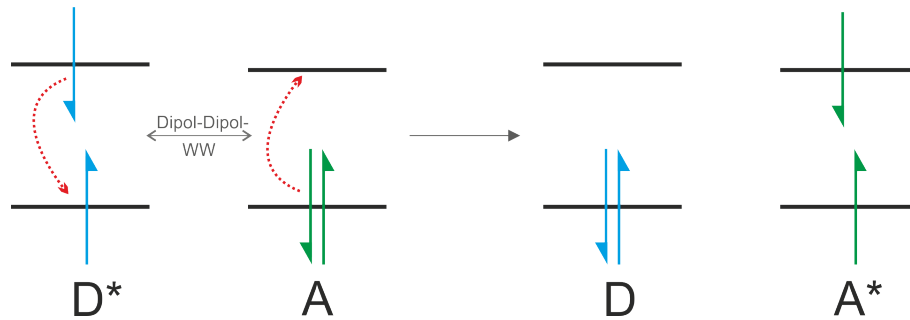


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung eines FRET anhand der Energieniveaus

Dabei muss die Energiedifferenz zwischen beiden aufgrund der Energieerhaltung gleich sein. Zur Veranschaulichung dient ein Vergleich zur Absorption von Licht: Dort tritt eine Kopplung zwischen dem oszillierenden, elektronischen Feld der Lichtwelle mit den Übergangsdipolmomenten des Akzeptor-Moleküls auf. Die folgende Gleichung 2.28 stellt die Resonanzbedingung dar, die einen Übergang eines Elektrons vom Grundzustand des Akzeptors in einen seiner angeregten Zustände bewirkt (vgl. Gleichung 2.5):

$$\Delta E (A \rightarrow A^*) = h\nu \quad . \quad (2.28)$$

Beim FÖRSTER-Energietransfer tritt der angeregte Donor an die Stelle der Lichtwelle, sodass nun das von diesem Dipol induzierte elektrostatische Feld in Resonanz mit dem Akzeptor tritt, wie folgende Bedingung verdeutlicht:

$$\Delta E (A \rightarrow A^*) = \Delta E (D^* \rightarrow D) \quad . \quad (2.29)$$

Eine Verknüpfung der Energietransferrate k_{ET} aus Gleichung 2.20 mit den bereits genannten Faktoren für einen FRET stellte FÖRSTER mit der folgenden Gleichung 2.30 her:^[51,85]

$$k_{\text{ET}} = \frac{9000 \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_{\text{Fl,D}}}{128 \cdot \pi^6 \cdot n(\lambda)^4 \cdot N_A \cdot \tau_{\text{Fl,D}} \cdot r^6} \int_0^\infty F_{\text{D}}(\lambda) \cdot \varepsilon_{\text{A}}(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda, \quad (2.30)$$

beziehungsweise vereinfacht

$$k_{\text{ET}} = 0,529 \cdot \frac{\kappa^2 \cdot \Phi_{\text{Fl,D}}}{n(\lambda)^4 \cdot N_A \cdot \tau_{\text{Fl,D}} \cdot r^6} \cdot J, \quad (2.31)$$

mit κ^2 = Orientierungsfaktor,
 $n(\lambda)$ = Brechungsindex des Mediums bei der gewählten Wellenlänge,
 N_A = AVOGADRO-Konstante = $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$,
 $\Phi_{\text{Fl,D}}$ = Fluoreszenz-Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,
 r = Abstand zwischen Donor und Akzeptor [nm],
 $\tau_{\text{Fl,D}}$ = Lebenszeit des angeregten Donors in Abwesenheit des Akzeptors [s],
 J = Überlappungsintegral (s. Gl. 2.19).

Der Orientierungsfaktor bezieht sich auf die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente beider Moleküle zueinander. Ähnlich wie in Kapitel 2.5.1 sorgt eine parallele Anordnung für den größten Effekt: bei Dimeren findet eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums und damit energiereicherer Übergang statt,^[74] bei einem FRET ist in dieser Anordnung die Wahrscheinlichkeit für einen Transfer am größten.^[51] Der Orientierungsfaktor kann Werte zwischen 0 (senkrecht zueinander) und 4 (parallele Anordnung) annehmen.^[86,87] Zur Berechnung dieser Werte dient Gleichung 2.32. Die dort angegebenen Winkel werden in Abbildung 2.10 dargestellt.

Da der Orientierungsfaktor unter experimentellen Bedingung selten bekannt ist, wird zur Berechnung meist ein Wert von $\frac{2}{3}$ angenommen. Dies ist ein durchschnittlicher Wert, wie er unter isotropen Bedingung, wie sie in einem flüssigen Medium gegeben sind, gültig ist. Dabei wird angenommen, dass Donor und Akzeptor in einer höheren Geschwindigkeit rotieren als die Zeit des angeregten Zustandes des Donors beträgt. Dies kann jedoch insbesondere bei an Farbstoff gebundenen Farbstoffen zu großen Fehlern führen.^[86,87]

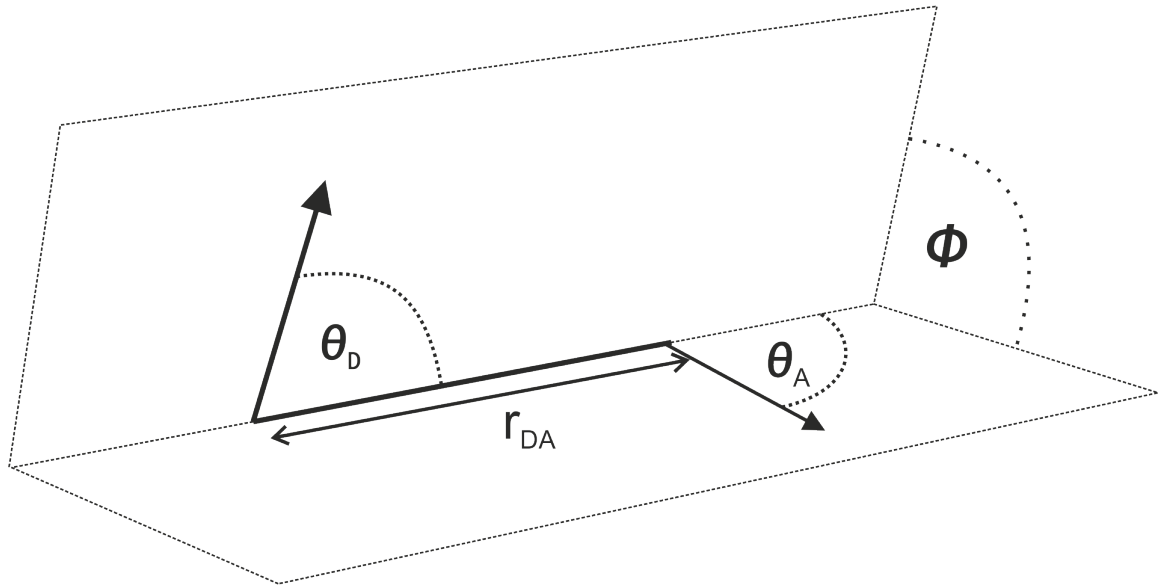


Abbildung 2.10: Visualisierung der benötigten Winkel zur Orientierungsfaktorberechnung (s. Gleichung 2.32 und des Abstandes r_{DA} zwischen Donor und Akzeptor.^{nach [51,86]}

$$\kappa^2 = (\sin\theta_D \sin\theta_A \cos\phi - 2 \sin\theta_D \sin\theta_D)^2 . \quad (2.32)$$

Die Transfer-Effizienz E gibt an, wie groß der Anteil an Photonen ist, die vom Donor absorbiert und an den Akzeptor weitergeleitet wurden.^[40] Sie kann sowohl aus zeitlicher als auch aus räumlicher Sicht berechnet werden:

$$E = \frac{k_{ET}}{\frac{1}{\tau_{Fl,D}} + k_{ET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} . \quad (2.33)$$

Bei R_0 handelt es sich um den so genannten FÖRSTER-Radius. Dieser stellt den Abstand zwischen Donor und Akzeptor dar, bei dem 50 % der Energie übertragen wird.^[77] Ein typischer Verlauf zwischen Abstand und Effizienz ist in Abbildung 2.11 dargestellt. Der FÖRSTER-Radius kann auch als der Abstand aufgefasst werden, bei dem die Wahrscheinlichkeit für einen Energietransfer auf den Akzeptor genauso groß ist wie die Desaktivierung des Donors durch die Gesamtheit anderer Prozesse, beispielsweise IC. Für gewöhnlich liegt R_0 im Bereich zwischen 10 und 100 Å^[51] und damit gut im Größenbereich von Biomolekülen. Durch geschickte Positionierung zweier Farbstoffe mit bekannten Parametern wie Quantenausbeute und Überlappungsintegral lassen sich beispielsweise Informationen über spezifische Bindungsmechanismen zwischen Ligand und Rezeptor gewinnen.^[88] Prozesse in der Zelle,^[7] Dynamik-Betrachtungen von Proteinen und Nukleinsäuren^[8,9,40,89,90] sowie die Hybridisierung von Nukleinsäuren^[9,10] gehören ebenfalls zu den typischen Anwendungsgebieten von FRET.

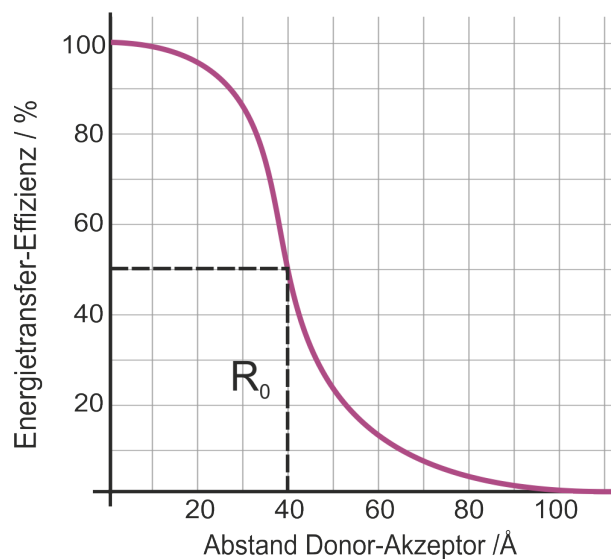


Abbildung 2.11: Beim FÖRSTER-Abstand (hier 40 Å) zwischen Donor und Akzeptor beträgt die Energietransfer-Effizienz 50 %.^{nach [51]}

2.5.2.2 DEXTER-Energietransfer

Die Anfangs- und Endzustände der beteiligten Moleküle sind beim DEXTER-Energietransfer (DET) identisch zum FRET: Zu Beginn liegen ein Donormolekül D^* im angeregten Zustand und ein Akzeptormolekül im Grundzustand A vor. Die Donoremission und die Akzeptorabsorbanz müssen auch in dieser Art des Transfers spektral überlappen. Nach erfolgtem Transfer befindet sich D im Grund- und A^* im angeregten Zustand. Der Unterschied liegt in dem Weg dorthin: Im Gegensatz zum FRET kommt es beim DET zu einem direkten Elektronenaustausch zwischen Donor und Akzeptor. Ist der Abstand beider Moleküle zueinander kleiner als ihr VAN-DER-WAALS-Radius, so kann es zu einer Überlappung der Orbitale kommen.^[26] Dies ermöglicht einen direkten Übergang des Elektron vom höheren *SOMO* des angeregten Donors direkt in das *LUMO* des Akzeptors. Im Gegenzug wandert ein Elektron aus dem *HOMO* des Akzeptors in das niedrigere *SOMO* des Donors (s. Abbildung 2.12).

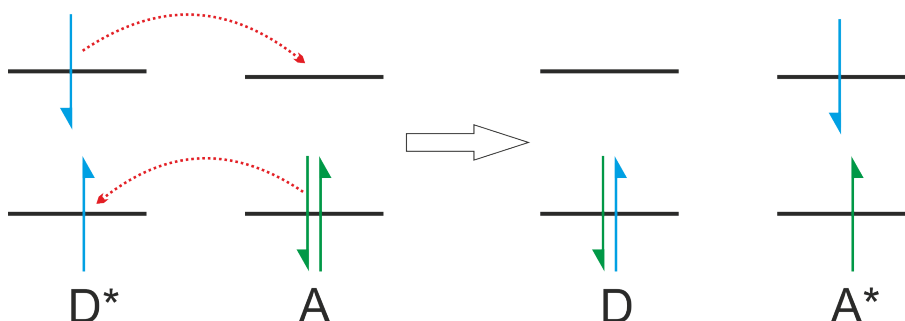


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des DEXTER-ET anhand der Energieniveaus.

Hierbei handelt es sich um einen Singulett-Singulett-Übergang. Dieser steht in Konkurrenz zu FRET, weshalb bei sehr geringen Abständen von D und A eine Trennung zwischen den einzelnen Transferraten schwierig ist.^[40] DET wird jedoch mit höherer Wahrscheinlichkeit in den Fällen stattfinden, in dem ein Übergang spinverboten ist: Die COULOUMBSchen Wechselwirkungen werden vernachlässigbar klein und ein Elektronenaustausch ist demnach wahrscheinlicher als der reine Energieaustausch.^[57] Abbildung 2.13 zeigt das Schema eines DET mit Beteiligung eines Triplet-Zustandes.

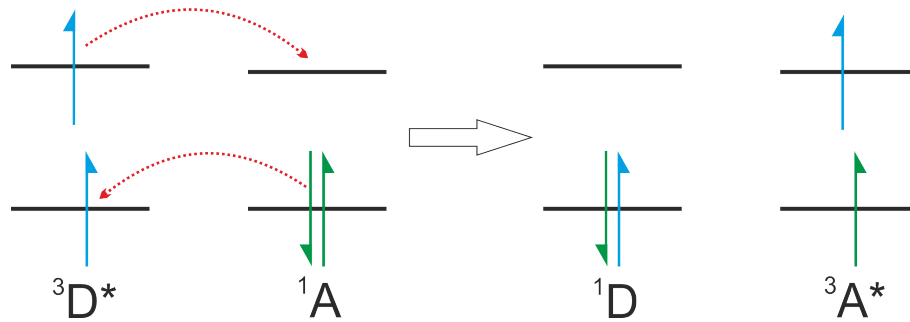


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des DEXTER-ET mit Tripletzustand-Beteiligung anhand der Energieniveaus.

Dieser Übergang verläuft im idealen Fall konzertiert. Kommt es zu einem zeitlichen Versatz zwischen der Abgabe des Donor-Elektrons und der des Akzeptor-Elektrons, so handelt es sich um einen *charge-transfer*-Prozess und die Zwischenstufen können als Exciplex aufgefasst werden.^[26]

Die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers k_{EIT} ergibt sich zu^[26]

$$k_{\text{EIT}} = K \cdot J \cdot e^{\frac{-2R_{\text{DA}}}{R_{\text{DA}}^0}}, \quad (2.34)$$

wobei K einen Parameter für die spezifische Orbital-Wechselwirkungen zwischen D und A darstellt und J das spektrale Überlappungsintegral, welches neben der aus Gleichung 2.19 bekannten flächennormierten Donoremission $F_{\text{D}}(\lambda)$ auch einen Wert für den ebenfalls flächennormierten Extinktionskoeffizienten ϵ_{A} enthält. Beim DET ist J somit unabhängig von der Absorptionseigenschaft des Akzeptors und von der Oszillatorstärke des $\text{A} \rightarrow \text{A}^*$ -Überganges. R_{DA} ist der (momentane) Abstand zwischen D und A, R_{DA}^0 der Abstand der beiden, wenn es zum Kontakt ihrer VAN-DER-WAALS-Radien kommt. Daraus wird ersichtlich, dass die Übertragungseffizienz nicht wie beim FRET vom Abstand in der sechsten reziproken Potenz abhängt, sondern expo-

nentiell. Die Transfereffizienz wird demnach vernachlässigbar, sobald der Abstand zwischen D^* und A auf das ein- bis zweifache des Moleküldurchmessers abfällt (etwa $5 - 6 \text{ \AA}$).^[26]

2.5.3 Energietransfer in Mehrfarbstoffsystemen

Wie die vorangegangenen Kapitel bereits zeigten, gibt es verschiedene Möglichkeiten für ein angeregtes Donormolekül, seine Energie an ein Akzeptormolekül abzugeben. Dabei muss es sich jedoch nicht immer um ein 1-Donor-1-Akzeptor-System handeln (Farbstoffe F_1 und F_2), sondern es kann um weitere Farbstoffe ergänzt werden (Farbstoffe F_3, F_4, \dots). Dabei gibt es verschiedene Varianten, die in den folgenden Abschnitten vorgestellt werden.

2.5.3.1 Mehrstufiger FRET

Bei einem mehrstufigen FRET folgen mehrere Transfers aufeinander, wobei sich die jeweiligen Absorbanz- und Emissionsspektren fortwährend überlappen müssen (s. Abbildung 2.14). Ein Vorteil dieser Anordnung ist, dass der letzte Akzeptor bei einer Anregung des ersten Donors nicht direkt mit angeregt wird. Eine mögliche Fluoreszenz kann daher nur vom einem Energietransfer stammen. MARTI *et al.* nutzten eine solche Anordnung, um Hybridisierungsschritte von RNA-Stängen (s. Kapitel 2.6) zu analysieren.^[16]

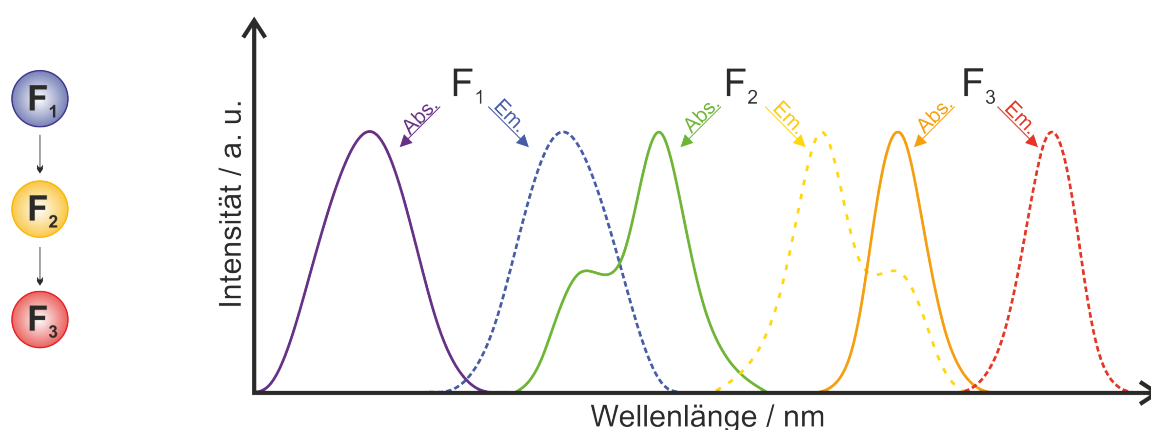


Abbildung 2.14: Mehrstufiger FRET. **links:** Einfaches Schema der aufeinanderfolgenden FRET-Prozesse. **rechts:** Willkürliche Absorbanz- und Emissionsspektren. Die durchgezogenen Linien stellen jeweils die Absorbanz dar, die gestrichelten die Emission.

Hierbei dient der erste Akzeptor gleichzeitig als Donor für einen dritten Farbstoff, der wiederum auch einen Donor für einen vierten Farbstoff darstellen könnte. Diese Reihe lässt sich beliebig fortsetzen, solange die Farbstoffe passende Energietransferraten ausweisen, die spektroskopischen Voraussetzungen im Sinne von Spektrenüberschneidungen erfüllt sind und sie theo-

retisch in der Lage sind zu fluoreszieren. Ein Quencher-molekül würde die Reihe beenden, da die Wahrscheinlichkeit für eine Energieübertragung über andere Wege höher wäre.

HAUSTEIN *et al.* nutzten eine solche Anordnung der Farbstoffe für die Untersuchung biologischen Proben, die größer sind als der durchschnittliche maximale FRET-Abstand: Bei zwei Farbstoffen liegt die maximale Distanz, in der noch Energie übertragen werden kann, bei etwa 100 Å. In der genannten Arbeit wurde es dagegen möglich, durch die genannte Anordnung den Abstand auf etwa 135 Å zu vergrößern.^[12]

Wie KIENZLER *et al.* in zwei Veröffentlichungen zeigen konnten, dient die Hinzunahme eines dritten Farbstoffes auch der besseren dreidimensionalen Bestimmung aller drei Farbstoffe.^[91,92]

2.5.3.2 Gegabelter FRET

Hierbei überlappt das Emissionsspektrum des Donors mit beiden Absorbanzspektren der zwei (oder mehr) Akzeptoren (s. Abbildung 2.15). Dies ermöglicht eine klarere Unterscheidung der Transfere von einem Donor auf den jeweiligen Akzeptor.

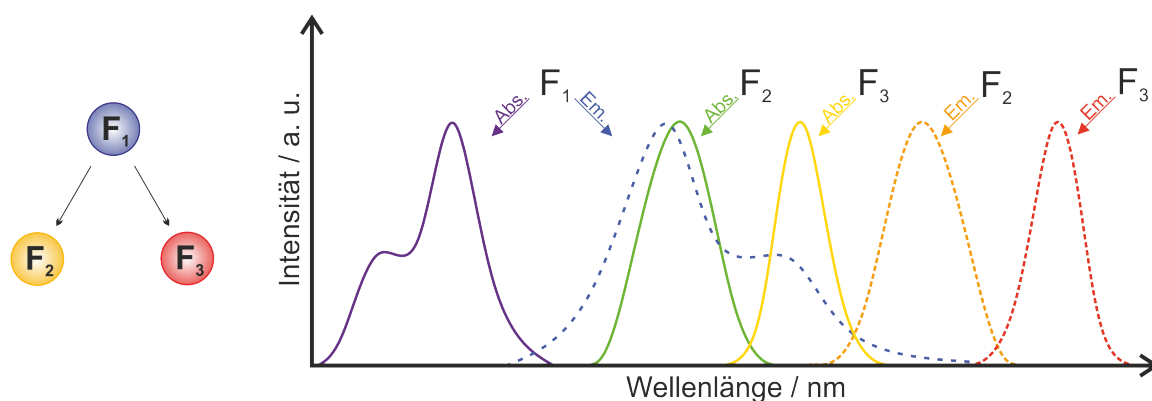


Abbildung 2.15: Gegabelter FRET. **links:** Einfaches Schema der gegabelten FRET-Prozesse. **rechts:** Willkürliche Absorbanz- und Emissionsspektren. Die durchgezogenen Linien stellen jeweils die Absorbanz dar, die gestrichelten die Emission.

F₁ hat hierfür meist eine breite Emissionsbande, mit der die Absorbanzspektren von F₂ und F₃ überlappen können, ohne selbst FRET untereinander zu betreiben. Hierfür weisen die beiden letztgenannten Farbstoffe idealerweise große STOKES-Shifts auf.

Prinzipiell angedacht wurde ein solches System von mehreren Gruppen.^[15,93,94] Eine praktische Umsetzung ist jedoch aufgrund der anspruchsvollen spektroskopischen Überlappungsvoraussetzungen schwierig. Einfacher ist es daher, die beiden Akzeptormoleküle räumlich stark zu trennen, sodass eine Unterscheidung der Signale nach wie vor möglich ist.^[94,95]

2.5.3.3 Multipler FRET

Der multiple FRET ist als eine Mischung der beiden vorherigen Varianten zu verstehen: Der Farbstoff F_1 überträgt auf F_2 und F_3 , jedoch F_2 ebenfalls auf F_3 (s. Abbildung 2.16)

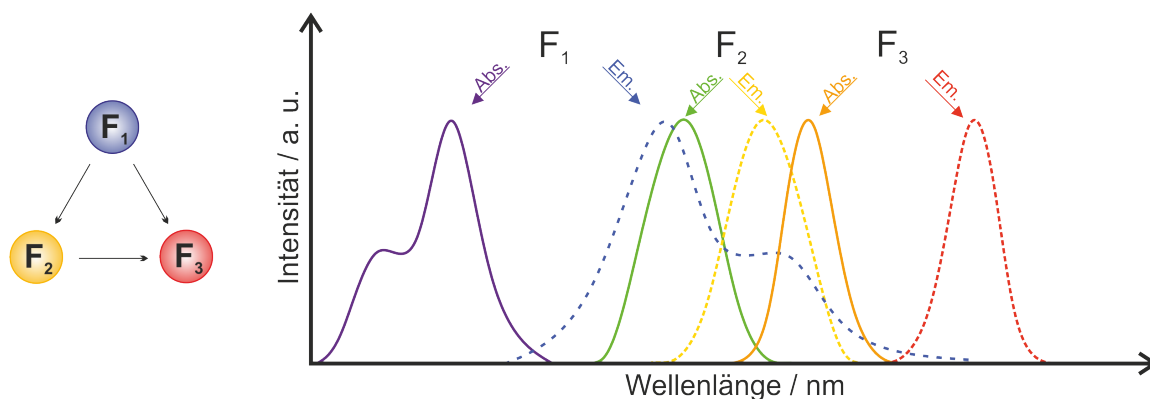


Abbildung 2.16: Multipler FRET. **links:** Einfaches Schema des multiplen FRET-Prozesses. **rechts:** Willkürliche Absorbanz- und Emissionsspektren. Die durchgezogenen Linien stellen jeweils die Absorbanz dar, die gestrichelten die Emission.

Spektral benötigt es hier einer Überlappung des Emissionsspektrums von F_1 mit beiden Absorbanzspektren von F_2 und F_3 . Im Gegensatz zum vorherigen Fall in Abschnitt 2.5.3.2, in dem starke STOKES-Shifts auftraten, liegen hier außerdem beide F_2 -Spektren so nah beieinander, dass die F_2 -Emissionsbande mit dem F_3 -Absorbanzspektrum überlappen kann. Die hat zur Folge, dass ein FRET zwischen F_2 und F_3 stattfinden kann.

BAILEY *et al.* nutzten einen solchen Aufbau von Donoren und Akzeptoren beispielsweise, um einen möglichst verlustfreien Energietransfer in speziellen Solarzellen zu ermöglichen.^[13] Die verwendeten Farbstoffe verfügten über hohe Fluoreszenz-Quantenausbeuten, schwache Wechselwirkungen der Moleküle untereinander und mittlere bis schwache Überlappungen der intramolekularen, beziehungsweise eigenen Absorbanz- und Emissionsspektren.

2.5.3.4 Gesplittet-gegabelter FRET

Eine theoretische Weiterentwicklung der unter 2.5.3.2 und 2.5.3.3 vorgestellten Transfer-Wege wäre der gesplittet-gegabelte FRET: Als Besonderheit läge hier keine Überlappung der Spektren von Donor und Akzeptor vor. Es würde sich vielmehr um eine *Up-* oder *Downconversion* der Energie handeln, welche formal an eine Zwei-Photonenanregung erinnert,^[96,97] aber im Gegensatz dazu eine weniger hohe räumliche und zeitliche Photonendichte benötigen würde.

Für eine *Upconversion* entspräche die Summe der Energien zweier Donoren der Energie des Akzeptors

$$E_{\text{Em},D_1} + E_{\text{Em},D_2} = E_{\text{Abs},A} \quad , \quad (2.35)$$

bei einer *Downconversion* würde ein Donor seine Energie auf zwei Akzeptoren aufsplitten

$$E_{\text{Em},D} = E_{\text{Abs},A_1} + E_{\text{Abs},A_2} \quad . \quad (2.36)$$

Daraus folgt, dass sich der einzelne Farbstoff im blauen Bereich des Lichtspektrums befinden müsste, wenn die beiden ähnlichen im roten liegen. Zur einfacheren Unterscheidung werden daher die Abkürzungen B (für den Farbstoff im blauen Bereich), R₁ und R₂ (für die Farbstoffe im roten Bereich, wobei R₁ den blauerer der beiden darstellt) eingeführt.

In einfacherer Schreibweise lassen sich nun die Gleichungen 2.35 und 2.36 wie folgt wiedergeben:

Upconversion:

$$R_1^* + R_2^* + B = R_1 + R_2 + B^* \quad , \quad (2.37)$$

Downconversion:

$$B^* + R_1 + R_2 = B + R_1^* + R_2^* \quad . \quad (2.38)$$

Die Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen und mögliche Energietransfere können vielfältiger Art sein und verschiedene Anteile an Prozessen aufweisen, wie sie in den vorherigen Kapiteln vorgestellt wurden. Sollte es beispielsweise zu exzitonischen Wechselwirkungen zwischen ihnen kommen, so sollte dies nach Kapitel 2.5.1 spektroskopisch durch batho-und hypsochrome Verschiebungen nachweisbar sein.

2.6 DNA

2.6.1 Chemischer Aufbau

Die DNA (von *deoxyribonucleic acid*, also Desoxyribonukleinsäure) ist der Träger der genetischen Information des Organismus. Sie liegt als Polymer vor, in der jedes Nukleotid-Monomer (abgekürzt mit nt) aus drei Untereinheiten besteht: der Desoxyribose, einem Phosphatrest und einer Base.

Bei der Desoxyribose handelt es sich um ein aus fünf Kohlenstoffatomen bestehendes Monosaccharid (Pentose), dessen C-1'-, C-3'- und C-5'-Atom jeweils eine Hydroxylgruppe trägt. Durch eine Diesterbindung mit dem Phosphatrest erfolgt eine Verknüpfung zweier Nukleotide zwischen dem C-5'-Atom der einen Pentose mit dem C-3'-Atom der Pentose des nachfolgenden Nukleotids (s. Abbildung 2.17). An beiden Enden der DNA, deren Bezeichnung immer am 5'-Ende beginnt, verbleibt eine ungebundene Hydroxylgruppe, die am 5'-Ende allerdings auch an einen Phosphatrest gebunden sein kann.^[98] Die Abfolge aus Saccharid und Phosphatgruppe

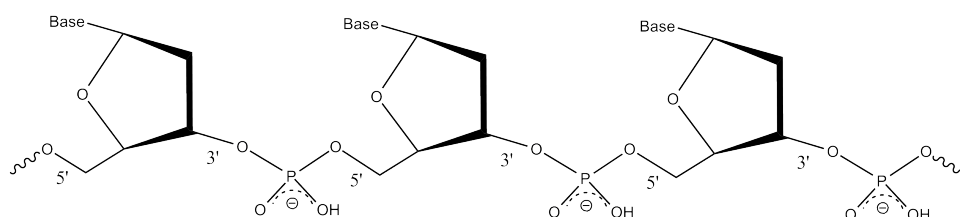



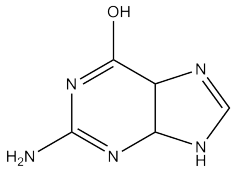
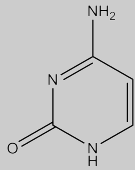
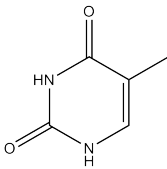
Abbildung 2.17: Die molekulare Struktur eines DNA-Stranges. Das Saccharid und die Base liegen real nicht in einer Ebene, sondern sind um 90° zueinander verdreht. Dies hilft bei der späteren Bindung zum anderen Strang, wobei der Winkel dann allerdings meist von 90° abweicht.

bildet ein negativ geladenes Rückgrat, das für jedes DNA-Molekül gleich ist. Erst die jeweilige Abfolge der vier unterschiedlichen Basen schafft die Einzigartigkeit jeder DNA.

Diese Basen lassen sich in Purin- und Pyrimidinderivate einteilen. Beide Gruppen reagieren lediglich schwach basisch und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem chemischen Aufbau: Die Pyrimidine weisen einen monocyclischen, die Purine einen bicyclischen Aufbau auf. Eine Übersicht aller vier DNA-typischen Basen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

Die Verknüpfung der jeweiligen Base an die Pentose erfolgt meist über eine β -N-glykosidische Bindung zwischen dem C-1'Atom der Pentose und dem N-9-Stickstoffatom einer Purinbase, bzw. dem N-1 Atom einer Pyrimidinbase.

Tabelle 2.1: Übersicht der wichtigsten, in der DNA hauptsächlich vorkommenden Basen.

Name	Abkürzung	Chemische Bezeichnung	Struktur
Adenin	A	6-Aminopurin	
Guanin	G	2-Amino-6-hydroxypurin	
Cytosin	C	2-Hydroxy-4-aminopyrimidin	
Thymin	T	2,4-Dihydroxy-5-methylpyrimidin	

2.6.2 Räumlicher Aufbau

1953 entdeckten ROSALIND FRANKLIN und MAURICE WILKINS anhand von Röntgenbeugungsbildern, dass es sich bei der DNA um eine Helixstruktur handeln muss, veröffentlichten diese Ergebnisse allerdings nicht. Erst JAMES WATSON und FRANCIS CRICK erstellten aus diesen Bildern und ihren eigenen Theorien das bis heute anerkannte DNA-Modell einer Doppelhelix (s. Abbildung 2.18).^[99] Sie und WILKINS erhielten dafür 1962 gemeinsam den Nobelpreis für Medizin.^[100]

Die helikale Form kann in der Regel nicht von einem einzelnen DNA-Strang eingenommen werden, sondern meist erst nach der Hybridisierung eines Stranges mit seinem Komplementärstrang. Darunter wird ein zweiter DNA-Strang verstanden, der in umgekehrter Laufrichtung zum Hauptstrang und somit vom 3'- zum 5'-Ende eine dem Hauptstrang entsprechende Basensequenz aufweist, da Purinbasen nur an Pyrimidine binden: WATSON und CRICK stellten fest, dass Adenin spezifisch an Thymin bindet und Guanin spezifisch an Cytosin.^[99] Die Gründe

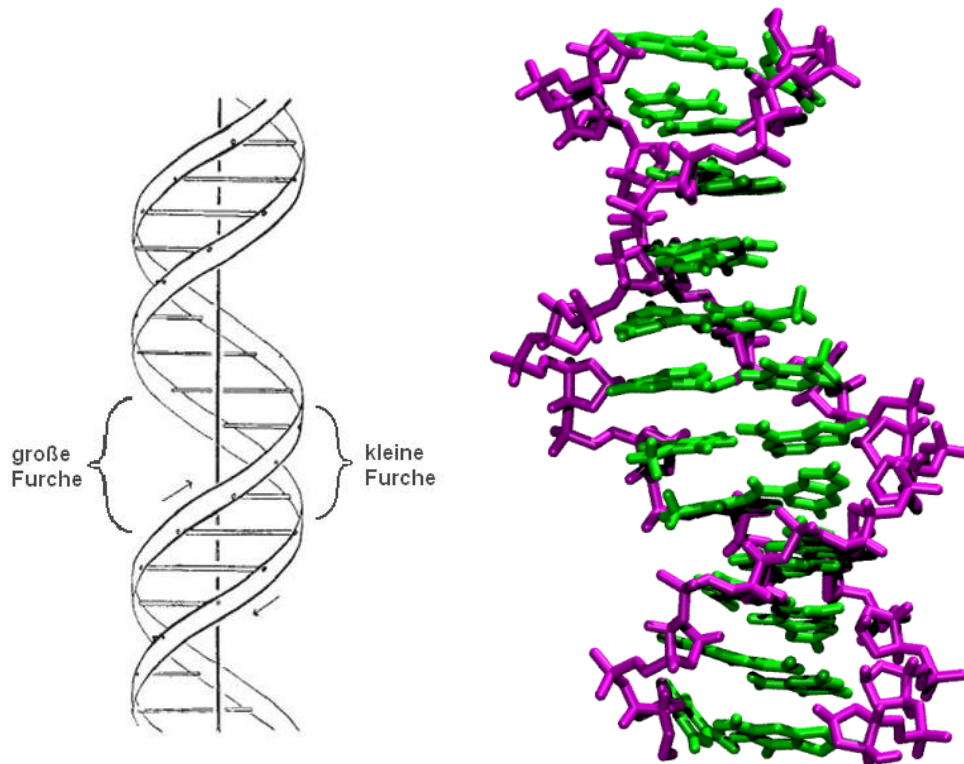


Abbildung 2.18: Watson-Crick-Modell der DNA-Doppelhelix.

Links: Schematische Darstellung der B-Konformation aus der Original-Veröffentlichung.^[99] Die große und kleine Furche (s. u.) wurde jeweils zusätzlich hervorgehoben.

Rechts: Kugelmodell der DNA (hier: das DICKERSON-Dodecamer, der „Proto-Typ“ der DNA^[101]).

hierfür liegen in dem molekularen Aufbau, der für die Kombination A-T genau zwei Wasserstoffbrückenbindungen untereinander zulässt, für die Kombination G-C genau drei (s. Abbildung 2.19).

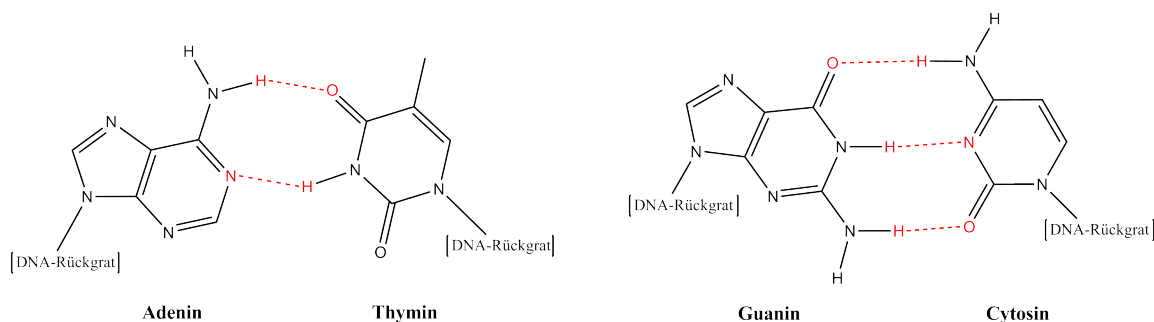


Abbildung 2.19: Die spezifische Basenpaarung der DNA. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen sind rot hervorgehoben.^{nach [98]}

Der energetische Gewinn ist minimal und wirkt sich nicht auf die Gesamtstabilität der DNA aus, die Verbindung A-T destabilisiert sie sogar.^[102] Diese Bindungen sorgen lediglich dafür,

dass sich zwei DNA-Einzelstränge, die (nahezu) komplementär zueinander sind, selbstständig aneinander binden. Dieses Prinzip kann allerdings auch zur Ausbildung einer Struktur führen, die sogenannten *Molecular Beacons*^[103] ähnelt und als Haarnadel-Struktur bezeichnet werden kann. Dabei entsteht eine Hybridisierung eines DNA-Stranges mit sich selbst. Der DNA-Strang muss hierfür über genügend komplementäre Basenpaare und über eine gewisse Länge verfügen, damit er flexibel genug ist. Für beide Möglichkeiten der Hybridisierung gilt jedoch, dass die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung der Bindungen mit abnehmender Anzahl komplementärer Basenpaare sinkt.^[98]

Je nach Temperatur liegt die DNA allerdings trotzdem bevorzugt einzel- oder doppelsträngig vor (s. Abbildung 2.20): Bei Raum- und Körpertemperatur dominiert die Helixform, bei stark erhöhten Temperaturen ist die Einzelstrangform die wahrscheinlichere. Da die komplementären Stränge untereinander nur durch Wasserstoff-Brückenbindungen verbunden werden, können diese leicht bei einer Temperaturerhöhung gelockert werden. Dabei wird die Temperatur, an der genau die Hälfte dieser Bindungen gelöst wurde, Schmelz- oder Hybridisierungstemperatur genannt. Je kürzer der DNA-Strang ist, desto tiefer liegt dieser Wert. Wird über diese Temperatur hinaus erhitzt, so überwiegt mehr und mehr der Anteil an ungebundenen Teilen der DNA, so dass sich ab ca. 90 °C ein so genannter „Knäuel-Zustand“ ausbildet, der aus unkoordinierten Einzelsträngen besteht.

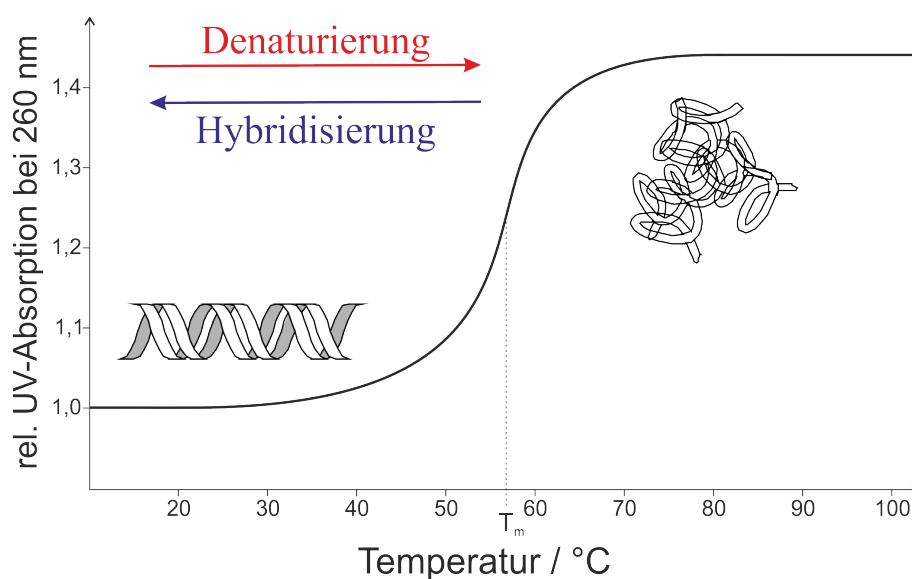


Abbildung 2.20: Einfluss der Temperatur auf den Zustand der DNA. In diesem Beispiel liegt die Hybridisierungstemperatur bei etwa 57 °C.^[104]

Dieser Denaturierungsprozess ist jedoch reversibel: Einzelstränge können durch schrittweises Abkühlen wieder zurück zu einem Doppelstrang hybridisieren. Wird die Temperatur dabei allerdings zu schnell verringert, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für Fehlpaarungen: Durch viele zufällige Wasserstoffbrückenbindungen können ungeordnete Bereiche in der DNA zurückbleiben.

Die B-Konformation (s. Abbildung 2.18) ist die unter natürlichen Bedingungen am häufigsten vorkommende Helix-Form. Sie weist definierte strukturelle Konstanten auf:^[98] Der Durchmesser des DNA-Moleküls beträgt 2,37 nm, die Höhe einer Windung 3,54 nm. Da zwischen zwei benachbarten Basen ein Abstand von 0,34 nm besteht, muss eine Windung 10,4 nt umfassen. Daraus ergibt sich wiederum, dass die Ebenen jeweils um ca. 36° zueinander verdreht sein müssen (1 Windung = $360^\circ \approx 10$ Basen). Es existieren darüber hinaus noch andere Konformationen der DNA, die sich hinsichtlich ihrer strukturellen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. So ist die Z-Form verglichen zu der B-Konformation schmaler und enger und wirkt wie „aufgezogen“. Zudem verläuft die Helix linksgängig. Die A-Konformation wirkt dagegen gestaucht: der Durchmesser ist größer und die Abstände enger. Allerdings ist sie wie die B-Form rechtsgängig.^[98]

Die hydrophoben Basen versuchen in wässriger Umgebung den polaren Lösungsmittelmolekülen aus energetischen Gründen eine möglichst geringe Oberfläche zu bieten. Daher drehen sie sich bei der B-Konformation so, dass sie nach innen und das negativ geladene Rückgrat der DNA durch die hydrophilen Phosphatgruppen und Saccharide nach außen zeigen. Die einzelnen Basenpaarungen, die als im einfachen Fall als planar angenommen werden können, stehen annähernd parallel zueinander und dadurch senkrecht zur Helixachse (s. Abbildung 2.21). Dieser Vorgang wird hydrophobe Stapelung genannt.

Zudem ziehen sich benachbarte Basen durch VAN-DER-WAALS-Kräfte an, da ihre exocyclischen Aminogruppen aufgrund ihrer positiven Partialladung mit den π -Elektronenwolken der Heterocyclen der benachbarten Basen wechselwirken.^[105] Die sich daraus ergebenden, einzelnen Energien betragen etwa nur 2 bis 4 J/mol und sind bei der Wechselwirkung mit Thymin aufgrund der fehlenden exocyclischen Aminogruppe am geringsten.^[98,105] Durch die große Anzahl an Gesamtbasenpaarungen summieren sich diese Einzelenergien jedoch auf, sodass diese Stapelkräfte maßgeblich verantwortlich für die große Stabilität der DNA sind und nicht die

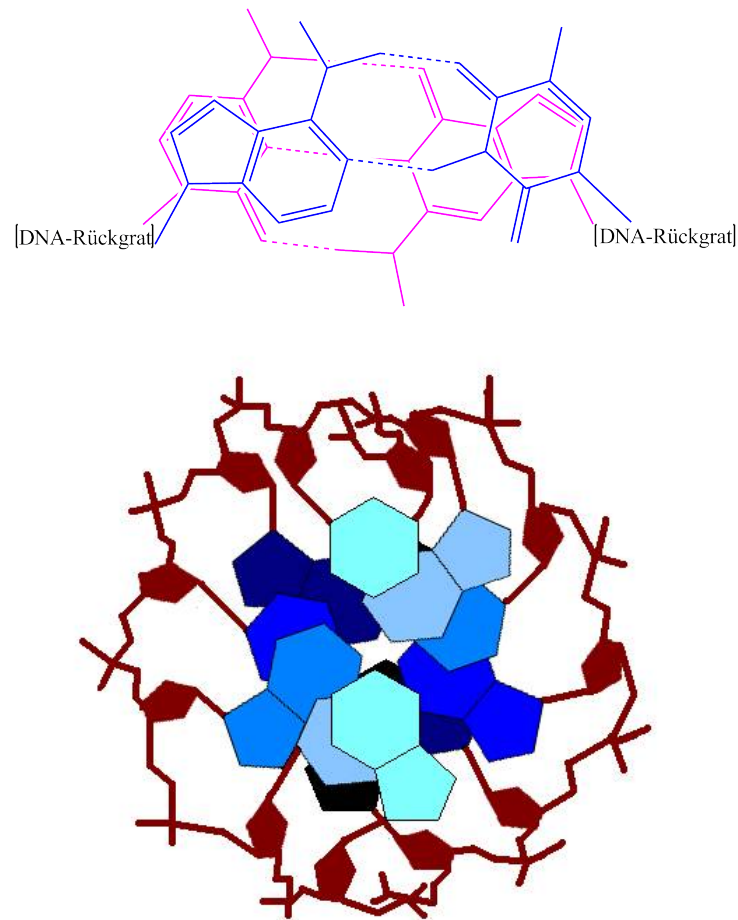


Abbildung 2.21: Schematische Darstellungen der Basenstapelung.^[1]

Oben: Aufsicht auf zwei beispielhafte Basenpaarbindungen zwischen sowohl Adenin und Thymin als auch Guanin und Cytosin. Es ist gut erkennbar, dass sich alle Basen in ihrer Größe und Anordnung gleichen (blau: Adenin und Thymin, magenta: Cytosin und Guanin)

Unten: Axiale Aufsicht auf eine Doppelhelix (blau: Basen, rot: DNA-Rückgrat)

spezifische Basenpaarung, welche in erster Linie nur ein Auswahlkriterium zur Bindung an mögliche Komplementärsträngen darstellt.^[98]

Das Eindrehen der Basen ist zudem der Grund für die Ausbildung der großen und der kleinen, bzw. einer weiten und einer engen Furche (s. Abbildung 2.18). Diese Furchen dienen biologisch gesehen wahrscheinlich als Erkennungspunkte für spezifische Angriffe von Proteinen wie Enzymen. Zusätzlich sorgt die Trennung der hydrophilen und -phoben Teile zum einen für eine gute Wasserlöslichkeit der DNA, zum anderen werden so die für die Erbinformationen wichtigen Basen geschützt.^[98]

3 Wahl des Fluorophor-DNA-Systems

Für einen Energietransfer ist es von hoher Bedeutung, dass die Donoremision nahezu isoenergetisch zur Akzeptorabsorbanz ist, was sich im spektralen Überlappungsintegral J (vgl. Kapitel 2.5.2) widerspiegelt. In einem Zweichromophoren-System lässt sich dieses anhand der Überlappung der jeweiligen Spektren identifizieren. In einem wie hier gewählten Dreifarbstoffsystem ist dies nicht möglich, da eine spektrale Lücke zwischen B und den roten Farbstoffen vorliegt. Daher muss vorher rechnerisch bestimmt werden, welche drei Farbstoffe sich optimal ergänzen: Die Summe der Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ der R-Farbstoffe muss dabei dem Wert der Wellenzahl des B-Farbstoffes entsprechen:

$$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}(\text{B}) = \tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}(\text{R}_1) + \tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}(\text{R}_2) , \quad (3.1)$$

$$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}(\text{R}_1) + \tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}(\text{R}_2) = \tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}(\text{B}) , \quad (3.2)$$

beziehungsweise in Wellenlängen:

$$\frac{1}{\lambda_{\text{EmissionB}}} = \frac{1}{\lambda_{\text{AbsorptionR}_1}} + \frac{1}{\lambda_{\text{AbsorptionR}_2}} , \quad (3.3)$$

$$\frac{1}{\lambda_{\text{EmissionR}_1}} + \frac{1}{\lambda_{\text{EmissionR}_2}} = \frac{1}{\lambda_{\text{AbsorptionB}}} . \quad (3.4)$$

In dieser Arbeit wurden verschiedene Arten von Farbstoff-Kombinationen verwendet, welche sich hinsichtlich der räumlichen und energetischen Lage der einzelnen Farbstoffe in drei Gruppen unterteilen lassen: In einer ersten qualitativen Einordnung werden Gruppe I und II zusammengefasst als die Kombinationen, deren Farbstoffzusammensetzungen die Gleichungen 3.1 bis 3.4 erfüllen. Gruppe III hingegen war auf keinen direkten Transfer ausgerichtet. Eine genauere Betrachtung dieser energetischen Voraussetzungen erfolgt in Kapitel 3.4.

Zudem wurden die Farbstoffe unterschiedlich an den DNA-Strängen positioniert, um den Einfluss eines variierenden Abstandes auf die Spektren analysieren zu können. In Gruppe I und III wurde der Abstand zwischen R_1 und R_2 auf vier Basenpaare festgesetzt, in Gruppe II auf mindestens acht. Der absolute Abstand ergibt sich letztendlich jedoch nicht nur aus der Anzahl der zwischen ihnen liegenden Basenpaare, sondern auch aus dem Winkel zueinander, der durch

die Helixform der DNA entsteht. Wie diese beiden Faktoren korrelieren, wird in Kapitel 3.5 untersucht.

Zum besseren Verständnis der verwendeten Kombinationen wird jedoch zunächst in Kapitel 3.1 und 3.2 auf die grundsätzlichen spektroskopischen Eigenschaften der B- und R-Farbstoffe eingegangen.

3.1 Blauer Chromophor B

Die Gleichungen 3.3 und 3.4 zeigen die Notwendigkeit einen B-Chromophor einzusetzen, der im nahen UV-Bereich absorbiert: Läge das Absorptionsmaximum zu stark im sichtbaren Bereich, müsste mindestens einer der roten Farbstoffe über 800 nm absorbieren und fluoreszieren. Solche Farbstoffe sind allerdings nicht bereits an DNA gebunden erhältlich. Darüber hinaus darf der blaue Farbstoff nicht im mittleren UV-Bereich absorbieren und fluoreszieren, damit eine Unterscheidung von der DNA-Absorbanz ($\lambda_{\text{Abs,max}} = 260 \text{ nm}$) möglich ist. Zudem stehen auch in diesem Bereich keine käuflich zu erwerbenden Farbstoffe zur Verfügung.

Zur Erhöhung der Transferwahrscheinlichkeit sollten die Farbstoffe außerdem über ein gutes Absorptionsvermögen und somit einen hohen Extinktionskoeffizienten verfügen (möglichst $>20\,000 \frac{\text{L}}{\text{mol}\cdot\text{cm}}$, vgl. Gleichung 2.19).

Die Wahl fiel für den blauen Farbstoff auf bereits an DNA gelabeltes Pyren (IBA GmbH, Göttingen). Einerseits liegt das Absorbanz- beziehungsweise Emissionsmaximum sowohl durch die Angaben des Herstellers ($\lambda_{\text{Abs,max}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em,max}} = 376 \text{ nm}$),^[106] als auch durch vorherige Messungen bestimmt ($\lambda_{\text{Abs,max}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em,max}} = 379 \text{ nm}$)^[104] im erforderlichen Bereich der Kompatibilität mit den R-Chromophoren. Viele andere Farbstoffe, die bei einer ähnlichen Wellenlänge absorbieren, weisen einen starken STOKES-Shift auf, wodurch sich alle Maxima der R-Chromophore auf über 850 nm verschieben würden.

Des Weiteren nimmt der Extinktionskoeffizient von Pyren Werte zwischen $20\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (experimentell bestimmt)^[104] und $43\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (gemäß Hersteller)^[106] an. Extinktionskoeffizienten liegen in diesem Wellenlängenbereich in der Regel noch niedriger (vgl. Farbstoffübersicht der Herstellerseite^[106]), sodass die Werte von Pyren in Relation dazu als hoch einzustufen sind.

Bei dem polycyclischen, aromatischen Pyren (s. Abbildung 3.1) handelt es sich bei Raumtemperatur um ein gelbes Pulver (Schmelzpunkt ca. 149°C), das als reizend eingestuft wird

(R: 53, S: 24-61). Seine molare Masse beträgt 202,26 g/mol und es ist mit einer Löslichkeit von 0,135 mg/l Wasser (bei 25 °C) praktisch wasserunlöslich.^[107]

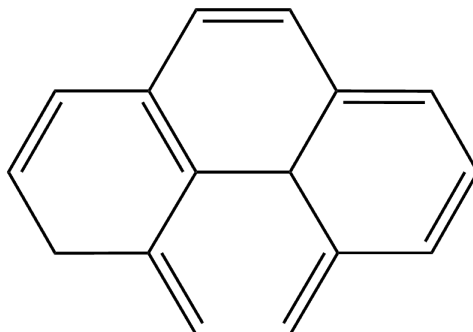


Abbildung 3.1: Strukturformel von Pyren.

Pyren neigt zur Excimerbildung^[67,68,108,109] und DNA-Interkalation.^[110–112] Dies bedeutet, dass sich Pyren als Basenersatz in die Helix legen und in die Basenstapelung miteinbezogen werden kann, da seine Struktur der Nukleobasen stark ähnelt.

Eine weitere Besonderheit des Pyrens ist, dass bei der Absorption von Energie der Übergang eines Elektrons vom S_0 -Zustand nicht in den S_1 -Zustand erfolgt, sondern in den S_2 -Zustand.^[113] Der Übergang vom S_0 ins S_1 besitzt ein sehr kleines Dipolmoment^[114] und somit auch eine geringe Oszillatorstärke ($f \approx 0,0004$).^[113] Die Anregung erfolgt daher zunächst in das S_2 , das eine Oszillatorstärke von etwa 0,1617 aufweist.^[113] Die Fluoreszenz erfolgt jedoch weiterhin KASHAs Regel (s. Kapitel 2.4.1) folgend aus dem S_1 -Niveau.^[115] Aufgrund des oben genannten kleinen Übergangsdipolmomentes des Überganges zwischen S_1 und S_0 weist Pyren daher eine lange Fluoreszenzlebensdauer auf (ca. 200 - 400 ns).^[116]

3.2 Rote Chromophore R_1 und R_2

Jede der drei Gruppen* bestand aus vier unterschiedlichen Kombinationen an roten Farbstoffen. In mindestens eine dieser Kombinationen handelte es sich bei R_1 und R_2 um den gleichen Farbstoff, weshalb diese Art der Kombination als homochromophor bezeichnet wird.

Tabelle 3.1 zeigt eine nach Absorptionswellenlänge sortierte Übersicht aller verwendeten Farbstoffe. Aufgelistet sind sowohl ihre jeweiligen Extinktionskoeffizienten ϵ_A als auch ihre Absor-

* Gruppe I: kleiner Abstand, energetisch ähnlich; Gruppe II: großer Abstand, energetisch ähnlich; Gruppe III: kleiner Abstand, energetisch abweichend

banz- und Fluoreszenzmaxima, wie sie vom Hersteller in wässriger Lösung angegeben sind. Ihre jeweiligen Strukturen sind als Skelettform in Tabelle 11.3 des Anhangs zu finden.

Tabelle 3.1: Übersicht der verwendeten Farbstoffe R_1 und R_2

Farbstoff	$\lambda_{\max, \text{Abs}}$ / nm	$\lambda_{\max, \text{Fl}}$ / nm	Extinktions- koeffizient ϵ_A / $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	enthalten in Kombination
Atto 514	511	533	115 000	III-b, III-c, III-d
Dy-632	637	657	200 000	I-d, II-d, III-d
Oyster680	674	693	250 000	I-c
Cy5.5	675	694	250 000	I-a, I-b, I-d, II-a,
Dy-700	707	730	140 000	I-b, II-b
Dy-732	736	759	240 000	II-b, II-c
Dy-776	771	801	240 000	II-c
Alexa Fluor® 790	785	810	260 000	III-a, III-c
IRDye800	787	807	240 000	II-b

Werte: IRDye800:LI-COR Biosciences;^[117] alle anderen: IBA^[106]

3.3 Allgemeine Zusammensetzung der Proben

Aus den sechs vorhandenen Strängen (B-, R_1 - und R_2 -Strang jeweils gelabelt und ungelabelt) wurden alle sieben möglichen Kombinationen hergestellt. Zusätzlich wurden einige Messreihen um eine Nacktstrangprobe (NNN) als Kontrolle ergänzt. Alle Kombinationen sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

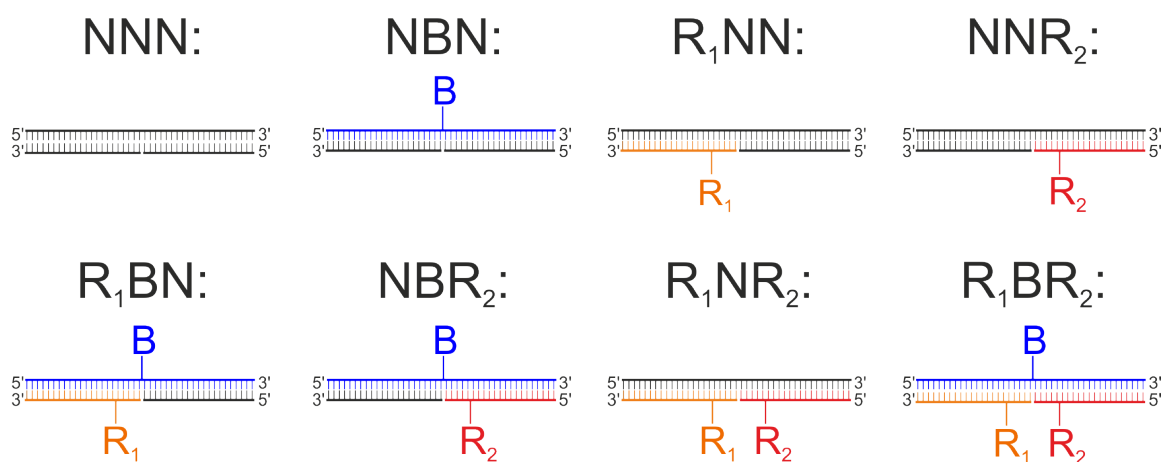


Abbildung 3.2: Probenübersicht.

Die Wahrscheinlichkeit für einen Energietransfer steigt, wenn jedem Donor mindestens die gleiche Anzahl an Akzeptor zu Verfügung steht. Dies ist auf ein Dreifarbstoffsystem übertragbar. In den zwei *Downconversion*-Proben der Gruppe II wurden alle drei Farbstoffe in gleichem Verhältnis hinzugegeben. In den anderen Fällen wurde Pyren im Überschuss eingesetzt.

Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht der hergestellten Farbstoffkombinationen und in welchem Verhältnis die Stränge in der jeweiligen Kombination vorlagen. Da Pyren in jeder Kombination als B verwendet wurde, ist es in dieser Tabelle nicht angegeben. Die gewählten Konzentrationen unterschieden sich je nach Messreihe. Sie lagen im Bereich zwischen 0,001 und 0,0036 nmol/ μ l und sind detailliert im Anhang zu finden (Tabellen 11.4 und 11.5).

Tabelle 3.2: Zusammensetzung aller hergestellten Kombinationen

Kombinations- nummer (#)	R ₁	R ₂	Verhältnis B:R ₁ :R ₂
I-a	Cy5.5	Cy5.5	1,25:1:1
I-b	Cy5.5	Dy-700	1,2:1:1
I-c	Oyster 680	Oyster 680	1,25:1:1
I-d	Dy-632	Cy5.5	1,2:1:1
II-a	Cy5.5	Cy5.5	1,25:1:1
II-b	Dy-732	IRDye800	1:1:1
II-c	Dy-732	Dy-776	1:1:1
II-d	Dy-632	Dy-700	1,2:1:1
III-a	Alexa Fluor 790	Alexa Fluor 790	1,25:1:1
III-b	Atto 514	Atto 514	1,25:1:1
III-c	Atto 514	Alexa Fluor 790	1,25:1:1
III-d	Atto 514	Dy632	1,25:1:1

3.4 Energetische Unterscheidung der Gruppen

In diesem Kapitel werden die bisher qualitativ betrachteten energetischen Ähnlichkeiten und Unterschiede quantitativ beschrieben. Hierzu werden in Tabelle 3.3 die bereits in Abschnitt 3.1 und Tabelle 3.1 genannten theoretischen Absorbanz- und Emissionswerte von B, R₁ und R₂

in Wellenzahlen zusammengefasst. Im Fall von R_1 und R_2 wird die energetischen Summe aufgezeigt. Dadurch wird ersichtlich, in welchen Kombinationen sich die Farbstoffe energetisch ähnlich sind (Gruppe I und II) und welche sich bewusst unterscheiden (Gruppe III). Gegebenenfalls wird zusätzlich hervorgehoben, auf welche Transferrichtung die Kombinationen ausgerichtet waren und welche Kombinationen sich lediglich energetisch ähnlich sind, aber nicht für eine der Transferrichtungen ausgelegt waren.

Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten Kombinationen

#	R_1	R_2	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}(R_1)$ + $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}(R_2)$ / $\cdot 10^4/\text{cm}$	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}(R_1)$ + $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}(R_2)$ / $\cdot 10^4/\text{cm}$	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}(B)$ / $\cdot 10^4/\text{cm}$	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}(B)$ / $\cdot 10^4/\text{cm}$	$\Delta_{\text{Min}} / \%$
I-a, II-a	Cy5.5	Cy5.5	2,96	<u>2,88</u>	<u>2,86</u>	2,64	0,88
I-b	Cy5.5	Dy-700	<u>2,90</u>	<u>2,81</u>	<u>2,86</u>	2,64	1,4
I-c	Oyster680	Oyster680	2,97	<u>2,89</u>	<u>2,86</u>	2,64	1,0
I-d	Dy-632	Cy5.5	3,05	<u>2,96</u>	<u>2,86</u>	2,64	3,7
II-b	Dy-732	IRDye800	<u>2,63</u>	2,56	2,86	<u>2,64</u>	0,38
II-c	Dy-732	Dy-776	<u>2,66</u>	2,57	2,86	<u>2,64</u>	0,64
II-d	Dy-632	Dy-700	2,98	<u>2,89</u>	<u>2,86</u>	2,64	1,2
III-a	Alexa 790	Alexa 790	<u>2,55</u>	2,47	2,86	<u>2,64</u>	3,5
III-b	Atto 514	Atto 514	3,91	3,75	2,86	2,64	31
III-c	Atto 514	Alexa 790	3,23	3,11	2,86	2,64	8,9
III-d	Atto 514	Dy-632	3,53	3,40	2,86	2,64	19

Durchgehend unterstrichene $\tilde{\nu}$ -Werte: geeignet für ein *Upconversion*-FRET; gestrichelt unterstrichene $\tilde{\nu}$ -Werte: geeignet für ein *Downconversion*-FRET; gepunktet unterstrichene $\tilde{\nu}$ -Werte: nicht optimal für einen Transfer, aber energetisch ähnlich

Bei einem Vergleich aller möglichen energetischen Zustände betragen die minimalsten Abweichungen der R-Chromophorensomme zu B im Mittel ($1,62 \pm 0,69$) % innerhalb der Gruppen I und II, innerhalb der Gruppe III dagegen ($19,7 \pm 5,8$) %. Hierbei ist anzumerken, dass die Energieunterschiede in den Fällen möglicher *Downconversion* (II-b und II-c zu III-a) mit nur 3 % insgesamt kleiner angelegt waren als in den anderen Fällen.

3.5 Positionierung der Farbstoffe an der DNA

Für FRET-Messungen zwischen Farbstoffen hat sich DNA als Trägersystem bewährt,^[118–122] da sie eine einfache Einstellung der Abstände der Farbstoffe untereinander erlaubt. Viele Firmen haben sich auf eine Herstellung kundenspezifischer DNA- und RNA-Sequenzen spezialisiert und bieten DNA-Stränge von Längen bis maximal 200 Basenpaaren (abgekürzt mit bp) an.^[123–125] Diese können mit einer großen Auswahl an Farbstoffen am 5'-Ende, am 3'-Ende oder intern modifiziert werden. Aufgrund dieser optimalen Voraussetzungen wurde sich daher in dieser Arbeit ebenfalls für ein DNA-basiertes Farbstoffsystem entschieden.

Bei der Auswahl der DNA-Stränge galt es zu beachten, dass viele Kombinationsmöglichkeiten bei möglichst geringer DNA-Stranganzahl umgesetzt werden können. Als Hauptstrang wurde sich für eine 60 bp lange Sequenz entschieden (ein so genanntes 60mer), an die der B-Farbstoff gebunden wird. Der komplementäre Strang dazu hätte als 60mer weniger Kombinationen zugelassen, sodass zwei sich auf 60 bp addierende DNA-Stränge (29mer + 31mer, 28mer + 32mer oder 26mer + 34mer) gewählt wurden, die jeweils einen der R-Chromophore tragen.

Für die exakte Positionierung der drei Farbstoffe an die DNA kommen mehrere Möglichkeiten in Frage: Wie bereits oben beschrieben, können sie am 5'-Ende, am 3'-Ende oder intern gebunden werden. Eine Modifizierung an den jeweiligen Enden führt bevorzugt zu einer Orientierung nach außen, was den Abstand jedoch vergrößern würde (siehe auch Abschnitt 3.5.2).^[118] Zudem lassen sich die Abstände der R-Chromophore untereinander gut variieren, wenn B stets mittig gebunden ist. So braucht lediglich der Abstand von R_1 zu R_2 zielgerichtet verändert werden, er lag hierbei zwischen vier und zehn Basenpaaren (bp). Ein kleinerer Abstand als 4 bp führt mitunter zu Kontaktquenching oder anderen unerwünschten Prozessen,^[9,94,126] ein größerer als 10 bp führt zu einer verringerten FRET-Effizienz: Bei einem Abstand von zehn Basenpaaren liegen die Farbstoffe ungeachtet der Helixverdrillung der DNA bereits 34 Å auseinander. Dieser Wert befindet sich zwar im Bereich typischer FÖRSTER-Radien (50 ± 30 Å),^[127,128] doch aufgrund der diffizilen Bedingungen des Dreiertransfers sollte die Energietransferwahrscheinlichkeit deutlich mehr als 50 % betragen, was mit einem Abstand von maximal 10 bp im Mittel gegeben ist.

Tabelle 3.4 gibt eine genauere Übersicht davon, in welcher Position der Farbstoff in der jeweiligen Kombination (hier abgekürzt mit „#“) an der DNA gebunden wurde und welche Abstände in Basenpaaren sich dadurch ergaben.

Tabelle 3.4: Übersicht der Farbstoffpositionierungen in allen Kombinationen und die sich daraus ergebende Abstände. Die Bezeichnungen der Positionen beziehen sich auf die Laufrichtung von 5' in 3'-Richtung.

#	R ₁	Stranglänge / bp	gelabelt an Position	R ₂	Stranglänge / bp	gelabelt an Position	Abstand R ₁ und R ₂ / bp
I-a	Cy5.5	31	28	Cy5.5	29	1	4
I-b	Cy5.5	31	28	Dy-700	29	1	4
I-c	Oyster680	31	28	Oyster680	29	1	4
I-d	Dy-632	31	28	Cy5.5	29	1	4
II-a	Cy5.5	34	25	Cy5.5	26	1	10
II-b	Dy-732	32	25	IRDye800	28	1	8
II-c	Dy-732	32	25	Dy-776	29	1	8
II-d	Dy-632	34	25	Dy-700	26	1	10
III-a	Alexa 790	31	28	Alexa 790	29	1	4
III-b	Atto 514	31	28	Atto 514 790	29	1	4
III-c	Atto 514	31	28	Alexa 790	29	1	4
III-d	Atto 514	31	28	Dy-632	29	1	4

3.5.1 Verlinkung der Farbstoffe an die DNA

Wie bereits oben erwähnt, werden die Farbstoffe nicht direkt an die DNA gebunden, sondern über Linker, die den Farbstoff und eine Nukleobase verbinden. Es handelt sich hierbei um Standardmoleküle der jeweiligen Firma, auf die kein Einfluss genommen werden kann. Der chemische Aufbau eines Linkers ist abhängig davon, ob der Farbstoff intern, am 3'- oder am 5'-Ende verbunden wird. In Abbildung 3.3 werden zwei Linker gezeigt, die für intern und 5'-gebundene Farbstoffe verwendet wurden.^[129]

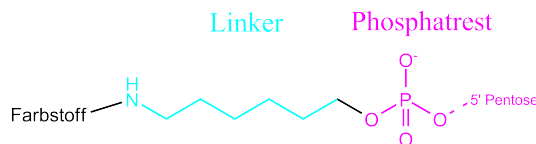
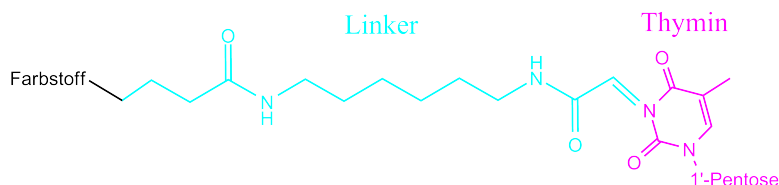
5'-Verlinkunginterne Verlinkung

Abbildung 3.3: Darstellung einer 5'-Verlinkung (oben) zwischen Farbstoff und DNA und einer internen (unten).

Der interne Linker weist eine Länge von etwa $13,6 \text{ \AA}$ auf und bindet direkt an eine beliebige Nukleobase (hier Thymin). Der andere Linker ist mit etwa $6,8 \text{ \AA}$ halb so lang und bindet an den Phosphatrest. Daher ist diese Art der Verlinkung nur am 5'-Ende möglich (vgl. Kapitel 2.6.1).

3.5.2 Korrelation zwischen Abstand und Winkel

Wie bereits in Kapitel 2.5.2.1 erläutert, gehören der Abstand der Farbstoffe und deren Orientierung zueinander zu den Kriterien, die die FRET-Effizienz beeinflussen. Wenn es sich bei der DNA um ein rein lineares Molekül handeln würde, könnten Abstände der Farbstoffe auf einfachem Weg eingestellt und berechnet werden. Da die DNA jedoch eine helikale Struktur aufweist, können sich die Farbstoffe voneinander wegrehen. Je nach Anzahl der Basenpaare zwischen ihnen sind die intramolekularen Abstände dadurch größer oder kleiner. Abbildung 3.4 zeigt beispielhaft, wie sich je nach Orientierung die Abstände zwischen zwei Farbstoffen, die sich an den äußeren Enden einer DNA befinden, zueinander verändern.

Die schematische Abbildung macht deutlich, dass die Farbstoffabstände durch die Anordnung nach außen (Fall 1) nahezu unabhängig von der Anzahl der zwischen ihnen liegenden Basenpaare sind, da diese Positionierung von vorneherein den maximalen Abstand zwischen A und B ermöglicht. CARDULLO et al. konnten zeigen, dass diese räumliche Anordnung gegenüber den folgenden Fällen bevorzugt ist.^[118] Zudem wird ersichtlich, dass die Abstände zwischen A und B lokale Minima aufweisen, wenn die Anzahl der Basenpaare zwischen ihnen fünf oder 15 beträgt, da hier die beiden Farbstoffe verdrillungsbedingt übereinanderliegen. Bei zehn Basenpaaren sind sie 180° voneinander entfernt und somit für diese räumliche Anordnung maximal. In Fall 3 liegen die Farbstoffe durch die Grundorientierung nach innen bereits näher beieinander

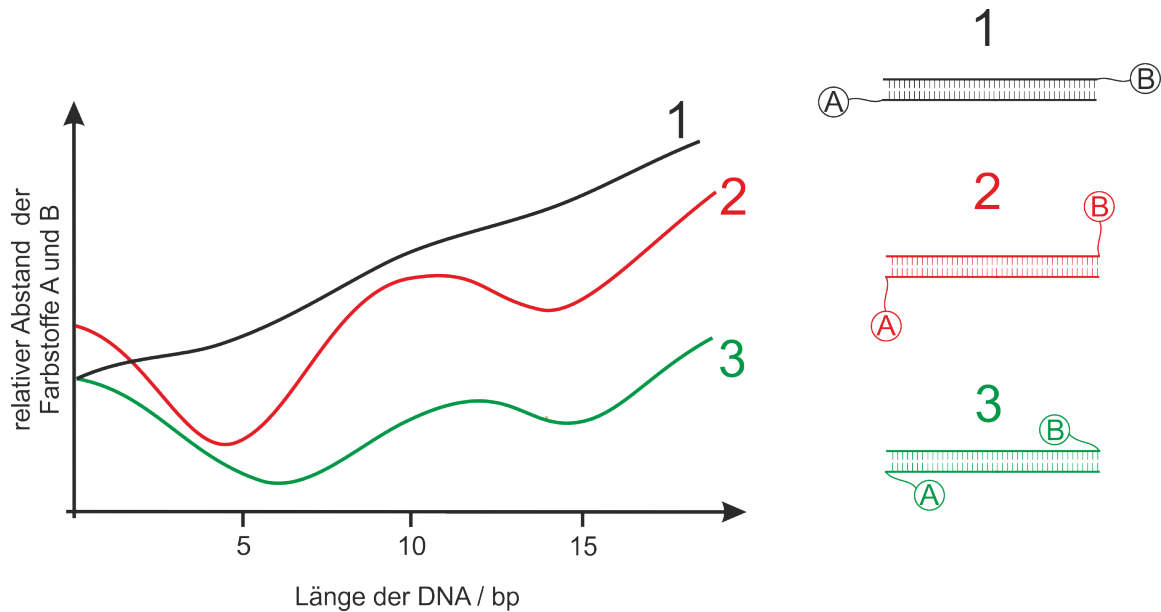


Abbildung 3.4: Orientierungsabhängige Abstände zweier Farbstoffe A und B, die an den Enden einer DNA gebunden sind. In Fall 1 (schwarz) sind die Farbstoffe parallel zur Helix angeordnet und nach außen zeigend. Fall 2 (rot) zeigt den Verlauf für eine 90°-Anordnung der Farbstoffe zur Helixachse. In Fall 3 liegen A und B annähernd parallel zur Helixachse, im Gegensatz zu Fall 1 (grün) allerdings nach innen zeigend. (frei nach CARDULLO et al.)^[118]

als in Fall 2, weshalb der jeweilige Abstand durchweg kleiner ist. Beachtet werden muss allerdings, dass die Linker, die als Verbindung zwischen Farbstoff und DNA dienen, meist so lang und flexibel sind, dass sich die Farbstoffe um ihre Ruhelage bewegen können. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Farbstoffe verwendet, die intern, beziehungsweise an den inneren Enden der kurzen DNA-Stränge gebunden waren. Eine Verlinkung nach außen war nicht sinnvoll, da der Abstand zwischen ihnen maximal zehn Basenpaare betragen sollte, aber DNA-Stränge dieser Länge oder kleiner nicht ausreichend aneinander binden.

3.5.2.1 Optimierter Winkel

Bei dieser Orientierung nehmen die Farbstoffe einen möglichst kleinen Winkel zueinander ein. Hierbei liegen R_1 und R_2 fast in einer Linie untereinander (sowohl bei Betrachtung des Linkers als starrer Abstandshalter als auch als flexibler Linker mit Schwankung um den Mittelpunkt): Sie sind im Abstand von 10 bp an die DNA gebunden und somit genau eine Helixwindung voneinander entfernt. B wurde mittig zu ihnen positioniert und besitzt damit einen Abstand von 5 bp zu beiden R-Chromophoren. (s. Abbildung 3.5).

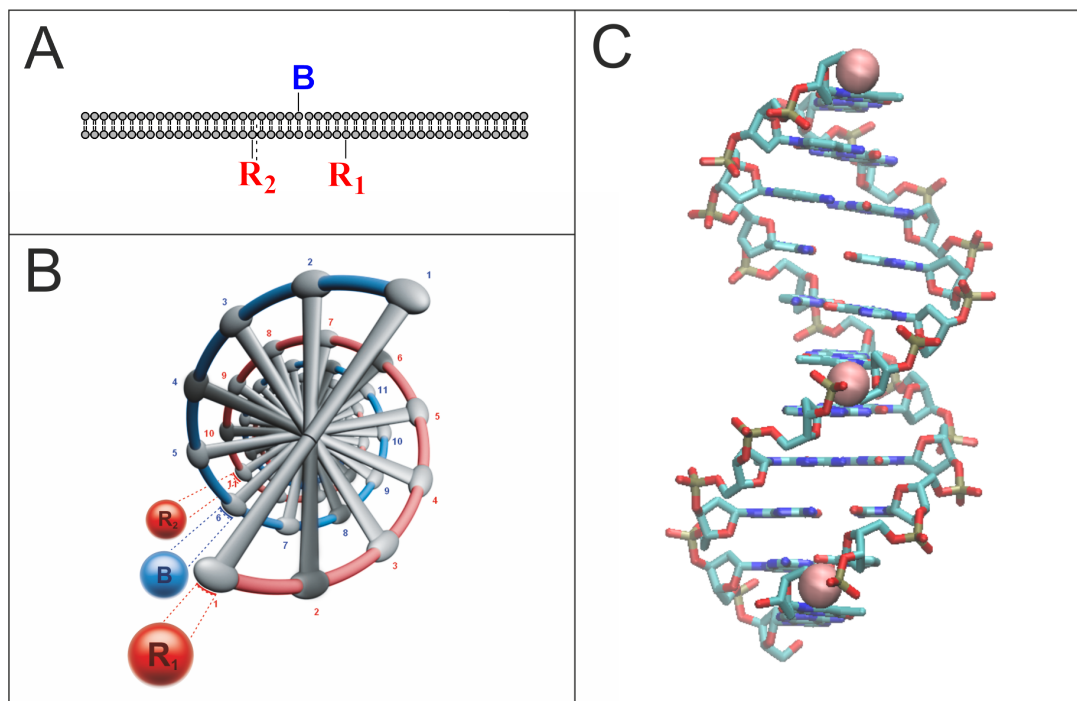


Abbildung 3.5: Darstellung der Winkel zueinander bei einem Abstand von 10 bp. **A:** lineare Darstellung der DNA mit gebundenen Farbstoffen; **B:** Blick von oben in die DNA zur besseren Ansicht der Winkelabstände; **C:** Helix-Darstellung der DNA mit gebundenen Farbstoffen

Zusätzlich wurden in den Kombinationen 4 und 6 die Abstände zwischen R₁ und R₂ auf 8 bp festgelegt, um den Einfluss von Winkel und Abstand noch besser untersuchen zu können.

3.5.2.2 Optimierter Abstand

In dieser Anordnung liegen die Farbstoffe R₁ und R₂ mit 4 bp formal näher zusammen als zuvor. B nimmt wiederum die mittlere Position ein und ist somit jeweils etwa 2 bp von den R-Chromophoren entfernt.

Dadurch beträgt der Winkel zwischen den beiden roten Farbstoffen allerdings 144°, was eine Ausrichtung in beinahe entgegengesetzter Richtung bedeutet. Dieser große Winkel und der Abstand zwischen B, R₁ und R₂ werden in Abbildung 3.6 veranschaulicht.

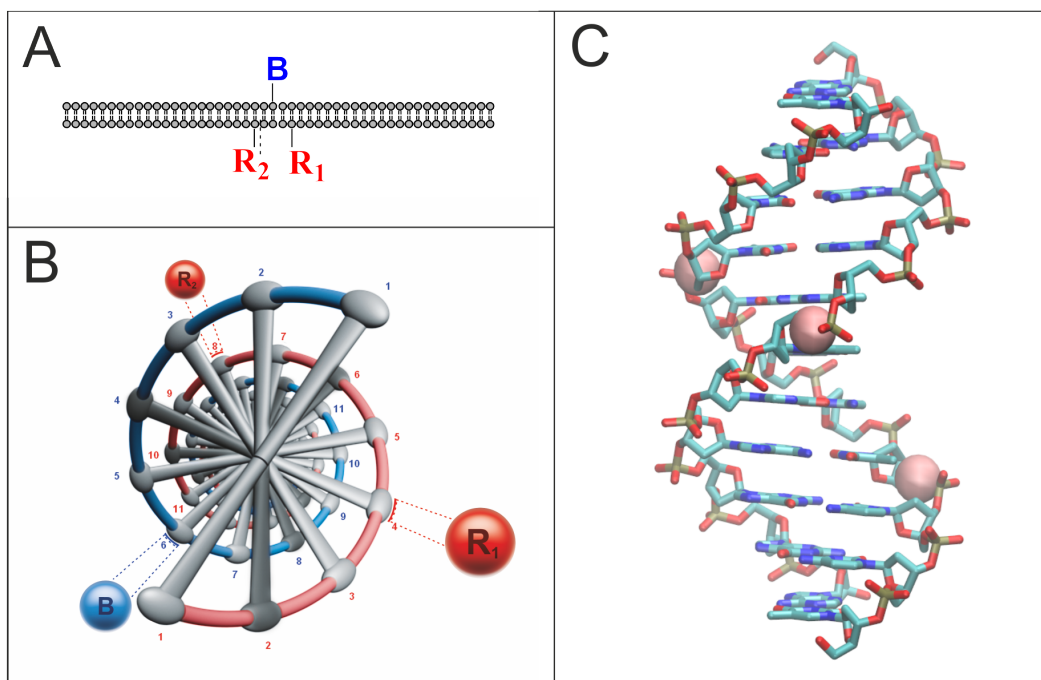


Abbildung 3.6: Darstellung der Winkel zueinander bei einem Abstand von 4 bp. **A:** lineare Darstellung der DNA mit gebundenen Farbstoffen; **B:** Blick von oben in die DNA zur besseren Ansicht der Winkelabstände; **C:** Helix-Darstellung der DNA mit gebundenen Farbstoffen.

3.5.2.3 Berechnung der Abstände zwischen R_1 und R_2

Wie in den vorherigen Abschnitten erläutert, herrschen zwischen den Farbstoffe je nach Kombination verschiedene Winkel und Abstände der Chromophore untereinander vor. Zusätzlich weisen die Linker, mit denen die Farbstoffe an den DNA-Strang gekoppelt sind, unterschiedliche Längen auf. Eine Abschätzung des Abstandes erfordert daher eine rechnerische Herangehensweise mit allen bekannten Werten: Als Grundlage dienten die Angaben für den Radius der DNA ($11,85 \text{ \AA}$),^[98] die oben genannten Linkerlängen von $6,8 \text{ \AA}$ (5'-Ende), beziehungsweise $13,6 \text{ \AA}$ (intern), der Winkel (36°)^[98] sowie der Abstand ($3,4 \text{ \AA}$)^[98] zwischen zwei Basenpaaren. Abbildung 3.7 zeigt das prinzipielle Schema der Berechnung.

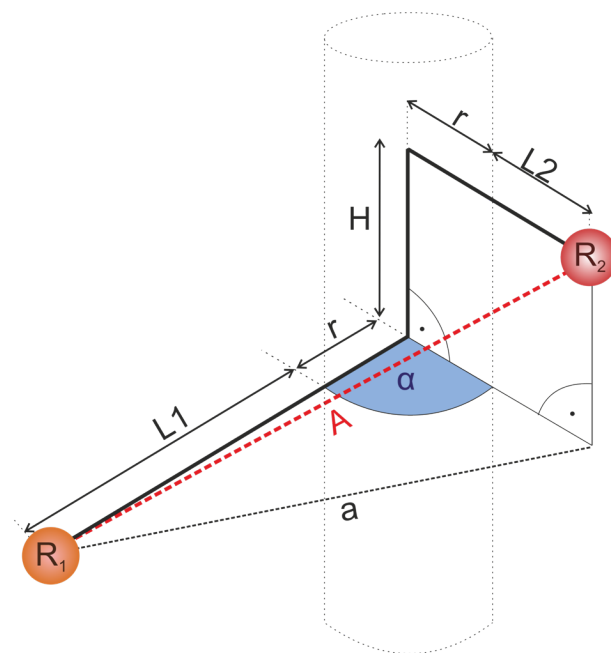


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Berechnung der Abstände zwischen R_1 und R_2 . (L_1 : Linker zu R_1 (immer intern); r : Radius der DNA; H : (Gang-)Höhe; L_2 : Linker zu R_2 (immer 5'); α : Winkel zwischen R_1 und R_2 ; A : mittlerer Abstand zwischen R_1 und R_2 ; a : Abstand, der lediglich zur Berechnung von A dient.)

Über die Beziehung des SWS-Kongruenzsatzes (Seite-Winkel-Seite) mit dem Kosinussatz lässt sich der gewünschte Abstand zwischen R_1 und R_2 in zwei Schritten wie folgt berechnen:

$$a = \sqrt{(L_1 + r)^2 + (L_2 + r)^2 - (2 \cdot (L_1 + r) \cdot (L_2 + r) \cdot \cos \alpha)} \quad (3.5)$$

$$A = \sqrt{a^2 + H^2} \quad (3.6)$$

Dadurch ergibt sich für den Abstand von R_1 und R_2 bei 4 bp Unterschied ein Wert von etwa 34 Å, für 8 bp etwa 36 Å und für 10 bp etwa 39 Å. Es ist also möglich, dass die Farbstoffe unabhängig von ihrer Position an der DNA im Schnitt etwa (36 ± 3) Å voneinander entfernt sind. Dabei wurde allerdings nicht beachtet, wie die Bindung der Linker und Farbstoffe an der Nukleobase räumlich aussehen wird. Möglich wären beispielsweise eine Bindung „nach innen“, sodass der Linker mittels der große Furche hindurch gebunden wird. Dabei fiel eine Wasserstoffbrückenbindung zum gegenüberliegenden Adenin zugunsten der kovalenten Linkerbindung weg. Die Basenstapelung selbst könnte dabei intakt bleiben. Denkbar wäre auf der anderen Seite auch, dass sich die jeweils kovalent an den Linker gebundene Base nach außen dreht: Das Rückgrat besteht lediglich aus Einfachbindungen und ist somit drehfähig. Beide Fälle haben einen Einfluss auf die Berechnung: für den ersten müsste der Radius im Term „ $L_1 + r$ “ weggelassen

werden, im zweiten müsste er doppelt eingehen. Auf eine gesonderte Berechnung wurde jedoch verzichtet, da sich beide Effekte im Mittel aufheben.

Tabelle 3.5: Übersicht der Farbstoffpaare bezüglich Abstand r und Winkel φ

#	R ₁	R ₂	$r_{(R_1 \leftrightarrow R_2)} / \text{bp}$	$r_{(R_1 \leftrightarrow R_2)} / \text{\AA}$	$\varphi_{(R_1 \leftrightarrow R_2)}$
I-a	Cy5.5	Cy5.5	4 bp	34	144°
I-b	Cy5.5	Dy-700	4 bp	34	144°
I-c	Oyster	Oyster	4 bp	34	144°
I-d	Dy-632	Cy5.5	4 bp	34	144°
II-a	Cy5.5	Cy5.5	10 bp	39	0°
II-b	Dy-732	IRDye800	8 bp	36	72°
II-c	Dy-732	Dy-776	8 bp	36	36°
II-d	Dy-632	Dy-700	10 bp	39	0°
III-a	Alexa 790	Alexa 790	4 bp	34	144°
III-b	Atto 514	Atto 514	4 bp	34	144°
III-c	Atto 514	Alexa 790	4 bp	34	144°
III-d	Atto 514	Dy-632	4 bp	34	144°

4 Experimenteller Teil

4.1 Technische Herstellung der Proben

Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Kombination ist es entscheidend, dass die Konzentration eines Bestandteils in allen Proben gleich ist. Daher wurde zunächst von jeder Stammlösung des jeweiligen Einzelstranges ($0,1 \frac{\text{nmol}}{\mu\text{l}}$) eine Vorlösung erzeugt (zwischen $0,01$ und $0,03 \frac{\text{nmol}}{\mu\text{l}}$). Dies hatte den Vorteil, dass mit größeren Volumina der Eppendorf-Pipetten gearbeitet werden konnte und so Pipettierungenauigkeiten vermindert wurden. Lediglich Kombination 4 und 6 wurden ohne Vorlösung direkt aus der Stammkonzentrationen hergestellt.

Als Puffer wurde eine Zusammensetzung nach WANG *et al.* gewählt: Hierfür werden 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl und 2 mM MgCl_2 im Verhältnis 1:1,25:1 gemischt.^[130] Es wurde vorweg eine etwa 1,5-fache Menge der benötigten Gesamtmenge an Puffer für alle Proben einer Kombination in einem separaten Gefäß angesetzt und von da aus in alle Reaktionsgefäße verteilt. So konnte dieselbe Gesamtzusammensetzung des Puffers in allen Proben gewährleistet werden und es blieb Vorratslösung zurück, um gegebenenfalls eine Probe neu ansetzen zu können.

Nach der Bereitstellung dieser Vorlösungen wurden mittels einer Eppendorfpipette 100 μl Probe aus konzentrationsabhängiger Menge an Wasser, Pufferlösung (stets 13 % des Gesamtvolumens) und Strangvorlösung hergestellt. Zur besseren Durchmischung aller Bestandteile wurden die Proben anschließend auf einem Vortexmischer („Top-Mix 11118“, Fisher Bioblock Scientific) einige Sekunden lang geschüttelt. Da sich für den anschließenden Hybridisierungsprozess (s. folgender Abschnitt 4.1.1) keine Lösung mehr im Deckel befinden sollte, wurden die Proben in einem nächsten Schritt bei einer Geschwindigkeit von 6000 Umdrehungen pro Minute etwa fünf Sekunden lang zentrifugiert (Gerät: „Micro Centrifuge 100 VAC“, Carl Roth).

4.1.1 Hybridisierung der Proben

Wie bereits unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben, kann die DNA temperaturabhängig bevorzugt als Einzel- oder als Doppelstrang vorliegen. Beim Herstellungsprozess muss sichergestellt werden, dass die zu mischenden DNA-Einzelstränge keiner Selbsthybridisierung unterliegen und dadurch nicht mehr für eine Bindung mit dem Komplementärstrang zur Verfügung stehen würden.,

Nachdem der Puffer und alle zu mischenden Stränge in das Reaktionsgefäß gegeben wurden, müssen die Proben daherzunächst auf über 90 °C erhitzt werden. Die sich daran anschließende langsame Abkühlung erhöht die Wahrscheinlichkeit der Bindung der richtigen Basenpaare und senkt gleichzeitig das Risiko der Knäuelbildung.

Zur automatisierten Umsetzung eines solchen Temperaturverlaufs wurde der *Thermocycler* „Primus 25 advanced®“ der PEQLAB Biotechnologie GmbH eingesetzt, der einen Temperaturgradienten von 0,1 bis 3 °C pro Sekunde aufweist. Die geschlossenen Reaktionsgefäße werden darin sowohl von unten als auch oben direkt erhitzt oder abgekühlt. Das selbst erstellte Hybridisierungsprogramm basierte auf den Angaben von WANG *et al.*^[130] Der Deckel wurde zunächst auf 110 °C erhitzt und behielt diese Einstellung den Rest der Messung über, um eine Kondensation des entstehenden Dampfes am Deckel zu verhindern. Das Gefäß wurde im nächsten Schritt für 2 min auf 95 °C erhitzt. Hierbei sollten sich alle Stränge voneinander gelöst haben. In einer Geschwindigkeit von 0,2 °C pro Sekunde wurde die Temperatur anschließend bis auf 50 °C erniedrigt. Dort wurde die Temperatur für acht Minuten gehalten, bevor in der gleichen Geschwindigkeit wie zuvor auf zunächst 40 °C und anschließend 30 °C gekühlt wurde. Die Temperatur wurde wiederum für acht Minuten bei der jeweiligen Einstellung gehalten. In einem letzten Prozessschritt wurde auf 22 °C heruntergekühlt (in 0,2 °C/min). Für die Dauer des Messtages wurde diese Temperatur gehalten, sodass alle Proben bei Entnahme 22 °C und somit durchschnittliche Raumtemperatur aufwiesen.

4.2 Absorbanzmessungen

Die Absorbanzspektren wurden mit dem UV/Vis-Spektrophotometer „Lambda 25“ der Firma Perkin Elmer® aufgenommen. Die Messungen wurden in einer Glasküvette (aus Quarzglas SUPRASIL®, Volumen des Probenraumes 3x3x5 mm, Firma Hellma®) gegen Luft als Referenz bei 22 °C gemessen. Um eine Anregung im Bereich zwischen 190 und 1100 nm zu ermöglichen, verfügt das Gerät über zwei Lichtquellen (Halogen- und Deuteriumlampe) (s. Abbildung 4.1).

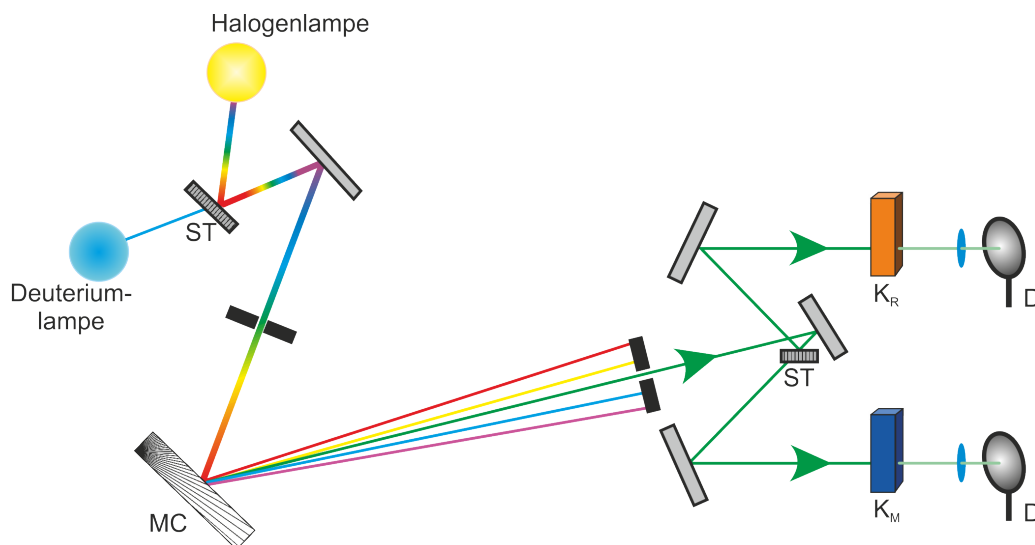


Abbildung 4.1: Aufbau des Absorbanzspektrometers (ST: Strahlenteiler; MC: Monochromator; K_R: Referenzküvette; K_M: Messküvette; D: Detektor)

Alle Absorbanzmessungen wurden in Bereichen von 200 bis 1000, beziehungsweise 1100 nm durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer Schrittweite von 1 nm und einer Geschwindigkeit von $120 \frac{\text{nm}}{\text{min}}$ aufgenommen. Dabei wurde auf eine Wiederholung der Spektren verzichtet, da in vorherigen Messungen gezeigt werden konnte, dass Spektren, die bei dieser gewählten Geschwindigkeit gemessen wurden, vernachlässigbar geringe Abweichungen untereinander aufweisen.^[104] Der Lampenwechsel wurde bei 300 nm eingestellt, da die Voreinstellung von 326 nm im erwarteten Absorptionsbereich von Pyren liegt.

Das Gerät beginnt stets mit der Aufnahme einer Autokorrekturmessung, welche für alle folgenden Messungen als Basislinie dient und intern automatisch von den Absorbanzwerten subtrahiert wird. Für alle Messungen blieb der Strahlengang für diese Autokorrekturaufnahme leer, sodass die Luftabsorbanz als Basislinie verwendet wurde. Um manuell alle störenden Absorbanzwerte (Streuungseffekte und Absorbanz der Küvette, Lösungsmittelabsorbanz, zeitabhängige Lampeneffekte) von den gemessenen Spektren subtrahieren zu können, erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Messung des Puffers in gleicher Konzentration wie in den angesetzten Proben in stets derselben Küvette, die auch für alle weiteren Messungen verwendet wurde.

Bei der Auswertung wurden die Spektren unterhalb von 1000 nm linear gefittet und der Punkt, an dem das Absorbanzspektrum des R₂ diese Gerade verlässt, als Nullpunkt für alle Proben der jeweiligen Kombination festgelegt. Zur späteren Mittelung der Originalwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen wurden alle Proben auf das R₁NR₂-Maximum der kleinsten Konzentration normiert und anschließend gemittelt. Die R₁NR₂-Probe lag in jeder Kombination vor

und dient in der späteren Präsentation der Ergebnisse als Ausgangspunkt der Betrachtungen im roten Absorbanzbereich.

4.3 Fluoreszenzmessungen

Für die Messungen der Emissionsspektren wurde das Fluoreszenz-Spektrophotometer „Cary Eclipse“ der Firma Varian® im Modus „Scan“ eingesetzt. Ein grobes Schema zum Aufbau des Photometers ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

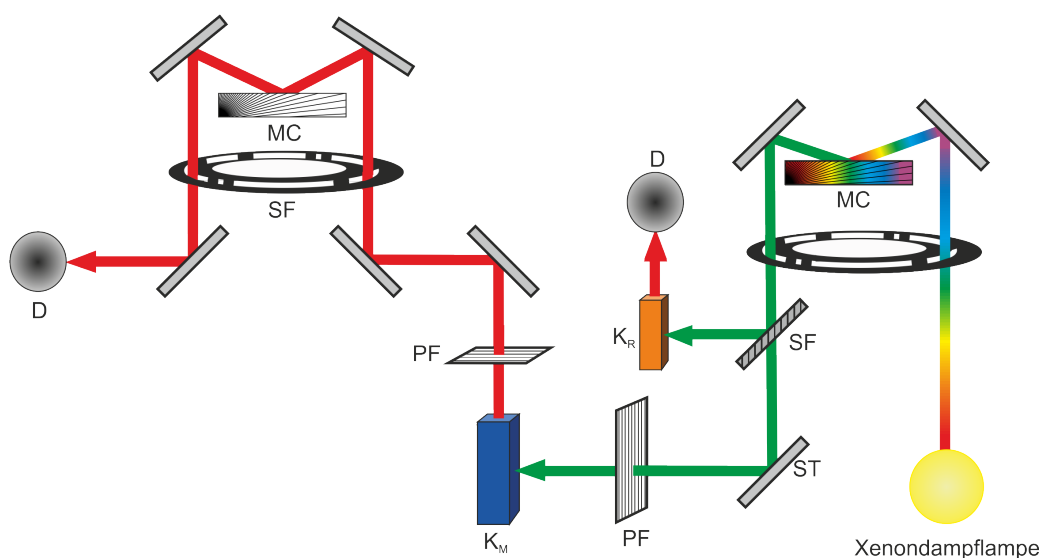


Abbildung 4.2: Aufbau des Fluoreszenzspektrometers (D: Detektor; K_M: Messküvette; K_R: interne Referenzküvette; MC: Monochromator; PF: Polarisationsfilter; SF: Schlitzfilter;)

Die Proben wurden bei 22 °C und in derselben Küvette vermessen, die auch für das Absorptionsspektrometer verwendet wurde. Die in den Absorbanzspektren bestimmten Maxima wurden bei der Aufnahme von Fluoreszenz-Emissionsspektren als Anregungswellenlänge verwendet. Eine genaue Übersicht aller proben- und gerätespezifischen Einstellungen und Messungen ist im Kapitel 11.1.2 des Anhangs zu finden. Die meisten gerätespezifischen Einstellungen blieben jedoch in der Regel identisch und wurden, sofern nicht anders angegeben, wie nachfolgend beschrieben verwendet: Als Aufnahme-Geschwindigkeit wurde die Einstellung „slow“ ($\hat{=}$ 120 $\frac{\text{nm}}{\text{min}}$) gewählt, um der Messgeschwindigkeit des Absorbanzspektrometers zu entsprechen. Die jeweilige Öffnungsweite des Anregungs- und Emissionsschlitzes betrug 5 nm. Als Anregungs- und Emissionsfilter wurden jeweils die Standardeinstellungen („Auto“ bei Anregung, „Open“ bei Emission) verwendet. Der Detektor wurde auf 600 V eingestellt. Die Wiederholungsrate der Spektren lag zwischen drei und 15.

5 Ergebnisse

5.1 Vorausgehende Untersuchungen

In diesem Kapitel wird auf die Ergebnisse eingegangen, die später die Basis für den wichtigsten beobachtbaren Effekt dieser Arbeit bilden (siehe Kapitel 5.2.1). Hierzu wird zunächst in Kapitel 5.1.1 und 5.1.2 auf die Absorbanz- und Emissionsmaxima der einzelnen Farbstoffe und ihre Verschiebung gegenüber den Angaben des Herstellers eingegangen. Welche Konsequenzen diese Werte für die angedachten *Up*- und *Downconversion*-Systeme haben, wird in Kapitel 5.1.3 wiedergegeben. Darüber hinaus kann das Absorbanzverhalten der DNA Aufschluss über die Gesamtkonzentration der jeweiligen Proben geben. Es wird daher in Kapitel 5.1.4 präsentiert.

5.1.1 Absorbanzmessungen von B, R₁ und R₂

Da Pyren in allen Proben den B-Farbstoff darstellte, wird auf ihn zuerst eingegangen. Pyren ergab über alle Kombinationen hinweg konstante Maxima bei etwa 350 nm im Haupt- und etwa 332 nm im Nebenmaximum, womit die Ergebnisse aus vorherigen Messungen bestätigt werden konnten.^[104] In Tabelle 5.1 werden die Mittelwerte der Proben angegeben, die sich am stärksten unterscheiden (B alleine in NBN und B mit beiden roten Farbstoffen in R₁BR₂). Es ist eine leichte hypsochrome Verschiebung der Maxima erkennbar, sobald alle drei Farbstoffe anwesend sind.

Tabelle 5.1: Übersicht der gemessenen Absorbanzmaxima von Pyren im Vergleich von Einzel- und Dreierprobe

Absorbanz-Hauptmaximum von B / nm		Absorbanz-Nebenmaximum von B / nm	
in NBN	in R ₁ BR ₂	in NBN	in R ₁ BR ₂
350,14 ± 0,20	349,89 ± 0,33	332,81 ± 0,41	331,41 ± 0,84

Die Absorbanzwerte der R-Farbstoffe variierten je nach Kombination, sodass ihre Maxima nicht verallgemeinert genannt werden können und stattdessen tabellarisch in 5.2 angegeben werden. Es fällt auf, dass es ebenfalls von Einzel- zu Dreierprobe zu Verschiebungen kommt, aber auch, sobald sich der Abstand zu anderen Farbstoffen, die Verlinkungsposition an der DNA oder der

zweite rote Farbstoff ändert. Dabei variiert sowohl die Ausprägung als auch die Richtung der Verschiebung.

Tabelle 5.2: Übersicht der gemessenen Absorbanzmaxima der verwendeten roten Farbstoffe

#	Absorbanzmaximum (in nm) von			Absorbanzmaximum (in nm) von		
	R ₁	... in R ₁ NN	... in R ₁ BR ₂	R ₂	... in NNR ₂	... in R ₁ BR ₂
I-a	Cy5.5	676,33 ± 0,44	677,50 ± 0,67	Cy5.5	677 ± 0	677,50 ± 0,67
I-b ^a	Cy5.5	677	679,5	Dy-700	713,5	716,5
I-c ^a	Oyster680	683	686	Oyster680	683	686
I-d ^a	Dy-632	631	629	Cy5.5	677	680
II-a	Cy5.5	676 ± 0	676,25 ± 0,25	Cy5.5	677,25 ± 0,25	676,25 ± 0,25
II-b	Dy-732	729,33 ± 0,44	724,33 ± 0,33	IRDye800	793,83 ± 0,22	794,67 ± 0,44
II-c	Dy-732	729 ± 0	727 ± 0	Dy-776	768,50 ± 0,50	765,50 ± 0,50
II-d	Dy-632	630 ± 0	628,50 ± 0,50	Dy-700	713 ± 0	715,75 ± 0,25
III-a	Alexa 790	781 ± 1	782 ± 0	Alexa 790	782 ± 0	782 ± 0
III-b	Atto 514	512 ± 0	513 ± 0	Atto 514	513 ± 0	513 ± 0
III-c ^a	Atto 514	512	513	Alexa 790	781	783
III-d	Atto 514	512,5 ± 0,5	512,5 ± 0,5	Dy-632	631 ± 0	633 ± 0

^a: hier lag nur eine Messreihe oder Konzentration vor, sodass keine Mittelwertbildung möglich war.

5.1.2 Emissionsmessungen von B, R₁ und R₂

Ziel war es, mit den durch Absorbanzmessung erhalten Maxima der Einzelfarbstoffproben alle weiteren darauf basierenden Proben der jeweiligen Kombination anzuregen.

Diese Anregungsmethode wurde jedoch nicht beim B-Farbstoff angewendet: Die Anregungswellenlänge von Pyren-enthaltenen Proben betrug stets 345 nm, obwohl das Absorbanzmaximum, wie in Tabelle 5.1 angegeben, 350 nm ergab. Der Grund hierfür liegt in der sich ergebenden höheren Emissionsintensität, wie der Anregungswellenlängentest in Abbildung 5.1 zeigt. Hier wurde eine repräsentative NBN-Probe in 5-nm-Schritten zwischen 340 und 370 nm angeregt.

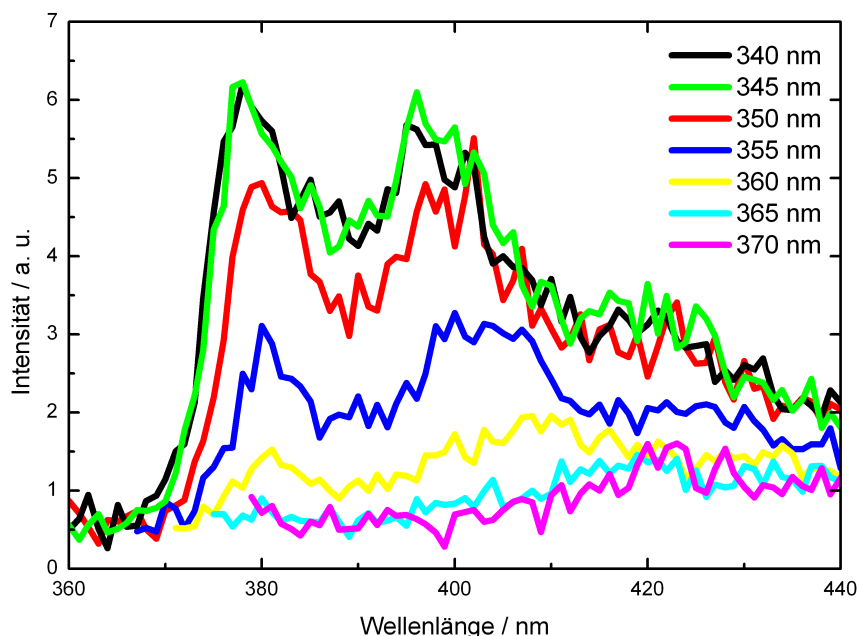


Abbildung 5.1: Anregungswellenlängen-Test. Hierbei wurde eine NBN-Probe zwischen 340 nm und 370 nm angeregt und das sich jeweils daraus ergebene Emissionsspektrum aufgezeichnet.

Es ist erkennbar, dass eine Anregung von 345 nm und darunter höhere Fluoreszenzintensitäten liefern als 350 nm und darüber. Da für einen möglichen Transfer alle Bedingungen optimal sein sollten, wurden daher die Proben aller Kombinationen bei 345 nm angeregt. Als Emissionsmaximum für Pyren ergab sich stets ein Wert von etwa 378,5 nm als Hauptmaximum, wie die Tabelle 5.3 zeigt:

Tabelle 5.3: Übersicht der Position der gemessenen Emissionsmaxima (bei Anregung im Absorbanzmaximum von NBN) von Pyren im Vergleich zwischen Einzel- und Dreierprobe

Emissions-Hauptmaximum von B		Emissions-Nebenmaximum von B	
von NBN	von R_1BR_2	von NBN	von R_1BR_2
$378,99 \pm 0,61$	$378,46 \pm 0,73\text{nm}$	$397,2 \pm 1,2$	$396,7 \pm 1,5$

Für die roten Chromophore wurde das Absorbanzmaximum der Einzelfarbstoffproben (R_1NN bzw. NNR_2) als Anregungswellenlänge aller weiteren Proben dieser Kombination verwendet. Die sich daraus ergebenden Positionen der Emissionsmaxima werden in Tabelle 5.4 gezeigt. Es wird darüber hinaus wieder unterschieden zwischen den Maxima, die in den R_1NN - beziehungsweise NNR_2 -Proben entstehen, und den Maxima der Dreierkombination R_1BR_2 . Auch hier kommt es teilweise zu hypso- oder bathochromen Verschiebungen, wenn alle drei Chromophore zusammentreffen.

Tabelle 5.4: Übersicht der gemessenen Positionen der Emissionsmaxima der R-Farbstoffe

#	Emissionsmaximum (in nm) von R ₁			Emissionsmaximum (in nm) von R ₂		
	mit R ₁	... in R ₁ NN	... in R ₁ BR ₂	R ₂	... in NNR ₂	... in R ₁ BR ₂
I-a	Cy5.5	695,90 ± 0,80	700,18 ± 0,78	Cy5.5	696,6 ± 1,0	700,18 ± 0,78
I-b ^a	Cy5.5	694,5	695	Dy-700	735	735
I-c ^a	Oyster680	708	706	Oyster680	705	706
I-d ^a	Dy-632	652	652	Cy5.5	695	697
II-a	Cy5.5	695,8 ± 2,1	695,24 ± 0,38	Cy5.5	696,37 ± 0,76	695,24 ± 0,38
II-b	Dy-732	753,67 ± 0,44	751,67 ± 0,89	IRDye800	807,67 ± 0,44	808,67 ± 0,44
II-c	Dy-732	753,05 ± 0,35	755,895 ± 0,025	Dy-776	795,705 ± 0,065	791,37 ± 0,17
II-d	Dy-632	652,005 ± 0,015	649,990 ± 0,020	Dy-700	733,51 ± 0,51	734,0 ± 1,0
III-a	Alexa 790	801 ± 0	805 ± 0	Alexa 790	804 ± 0	805 ± 0
III-b	Atto 514	530,5 ± 0,5	530 ± 0	Atto 514	530,5 ± 0,5	531 ± 0
III-c ^a	Atto 514	531	531	Alexa 790	804	805
III-d	Atto 514	531 ± 0	531 ± 0	Dy-632	632,5 ± 0,5	654 ± 0

^a: hier lag nur eine Messreihe oder Konzentration vor, sodass keine Mittelwertbildung möglich war.

5.1.3 Abgeleitete Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionswerte

In Tabelle 3.3 wurden die Summen der theoretischen Absorbanz- und Emissionsenergien der roten Farbstoffe mit den Energien des blauen Farbstoffes verglichen und ermittelt, welche Kombination für eine *Up*- oder *Downconversion* geeignet wäre. Da in den Kapiteln 5.1.1 und 5.1.2 gezeigt wurde, dass sich die spektroskopischen Maxima gegenüber den theoretischen Richtwerten des Herstellers verändert haben, stellt Tabelle 5.5 nun eine Übersicht der praktisch erhaltenen Absorbanz- und Emissionsenergien dar, wobei für die roten Farbstoffe wiederum nur die Summe angegeben wird. Die Werte beziehen sich auf den Wert des jeweiligen Maximums der Dreierkombination, um realistischere Bedingungen für eine mögliche Wechselwirkung aller drei Farbstoffe widerzuspiegeln.

Die Ergebnisse belegen, dass sich die Farbstoffe B, R₁ und R₂ innerhalb der meisten Kombinationen weiterhin so zueinander verhalten wie zuvor theoretisch bestimmt. Lediglich Kombinati-

Tabelle 5.5: Kombinationsübersicht mit praktisch bestimmten Werten.

#	R ₁	R ₂	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}$ (R ₁ in R ₁ BR ₂) + $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}$ (R ₂ in R ₁ BR ₂) / · 10 ⁴ /cm	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}$ (R ₁ in R ₁ BR ₂) + $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}$ (R ₂ in R ₁ BR ₂) / · 10 ⁴ /cm	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Abs}}$ (B in R ₁ BR ₂) / · 10 ⁴ /cm	$\tilde{\nu}_{\max}^{\text{Em}}$ (B in R ₁ BR ₂) / · 10 ⁴ /cm	Δ _{Min} / %
I-a	Cy5.5	Cy5.5	2,95	<u>2,86</u>	<u>2,86</u>	2,65	0
I-b	Cy5.5	Dy-700	<u>2,87</u>	<u>2,80</u>	<u>2,86</u>	2,65	0,35
I-c	Oyster680	Oyster680	2,92	<u>2,83</u>	<u>2,86</u>	2,65	1,1
I-d	Dy-632	Cy5.5	3,06	<u>2,97</u>	<u>2,86</u>	2,65	3,9
II-a	Cy5.5	Cy5.5	2,96	<u>2,88</u>	<u>2,86</u>	2,65	0,70
II-b	Dy-732	IRDye800	<u>2,64</u>	2,57	2,86	<u>2,65</u>	0,38
II-c	Dy-732	Dy-776	<u>2,68</u>	2,59	2,86	<u>2,65</u>	1,1
II-d	Dy-632	Dy-700	2,99	<u>2,90</u>	<u>2,86</u>	2,65	1,4
III-a	Alexa 790	Alexa 790	<u>2,56</u>	2,48	2,86	<u>2,65</u>	3,4
III-b	Atto 514	Atto 514	3,90	3,77	2,86	2,65	32
III-c	Atto 514	Alexa 790	3,23	3,13	2,86	2,65	9,4
III-d	Atto 514	Dy-632	3,53	3,41	2,86	2,65	19

Durchgehend unterstrichene $\tilde{\nu}$ -Werte: geeignet für ein *Upconversion*-FRET; gestrichelt unterstrichene $\tilde{\nu}$ -Werte: geeignet für ein *Downconversion*-FRET; gepunktet unterstrichene $\tilde{\nu}$ -Werte: nicht optimal für einen Transfer, aber energetisch ähnlich

on I-c könnte sich nicht mehr optimal für *Upconversion* eignen, da sich die Werte nunmehr nur ähneln.

Die Unterteilung der Gruppen (I und II zu III) bleibt dennoch erhalten: die Unterschiede der *Downconversion*-Kombinationen II-b und II-c sind noch immer 3 % kleiner als die der Kombination III-a, alle anderen der Gruppen I und II unterscheiden sich wiederum mindestens 5 % von den übrigen der Gruppe III.

5.1.4 Konzentrationsabgleich

Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb einer Kombination ist es entscheidend, dass die Konzentration aller Probenbestandteile gleich ist (s. Kapitel 3.3). Da alle Proben einer Kom-

bination aus denselben DNA-Strängen bestanden, lässt sich daher die Gesamtkonzentration anhand der DNA-Absorbanz bei 259 nm kontrollieren. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5.6 zusammengefasst. Dabei stellt die angegebene Abweichung eine Schwankung um den Mittelwert aus höchster und niedrigster Absorbanz dar.

Tabelle 5.6: Abweichung der Absorbanzwerte im Bereich der DNA-Absorption (259 nm)

Kombination	Messreihe/Konzentration	Abweichung [± %]
# I-a	Messreihe 1	1
	Messreihe 2, Konzentration 1	1
	Messreihe 3, Konzentration 1	6
	Messreihe 3, Konzentration 2	5
# I-b	Messreihe 1	7
# I-c	Messreihe 1	3
	Messreihe 2	1
# I-d	Messreihe 1	4
# II-a	Konzentration 1	5
	Konzentration 2	3
# II-b	Konzentration 1	13
	Konzentration 2	12
	Konzentration 3	12
# II-c	Konzentration 1	12
	Konzentration 2	10
# II-d	Messreihe 1	6
	Messreihe 2	3
# III-a	Konzentration 1	6
	Konzentration 2	6
# III-b	Konzentration 1	5
	Konzentration 2	4
# III-c	Messreihe 1	6
# III-d	Konzentration 1	4
	Konzentration 2	5

Es ist erkennbar, dass die Konzentrationen der Proben, die durch Vorlösungen hergestellt wurden, mit maximal $\pm 6\%$ in einem geringeren Maße um den Mittelwert schwanken. Die Proben, die direkt aus der Stammlösung erzeugt wurden*, weisen klar höhere Abweichungen auf.

5.2 Spektrale Effekte in Dreifarbstoffsystemen

In diesem Kapitel wird erstmalig ein sogenannter Seitenbandeneffekt präsentiert, der nur auftritt, wenn alle drei Farbstoffe anwesend sind und sie sich energetisch und räumlich nah sind. In der Literatur ist ein solcher Effekt in Systemen mit drei unterschiedlichen Farbstoffen noch nicht beschrieben worden. Er wird auf Seite 70 näher definiert und kann zunächst vereinfacht als eine Umverteilung der Übergangsintensitäten innerhalb eines Spektrums aufgefasst werden. In den folgenden Kapiteln 5.2.1 bis 5.2.5 wird schrittweise auf die Absorbanz- und Emissionsspektren der verschiedenen Kombinationen, getrennt nach roten und blauen Wellenlängenbereichen, eingegangen. Als repräsentative Kombinationen werden aus jeder der drei Gruppen stets diejenigen intensiver betrachtet, in denen R_1 und R_2 gleich sind (Kombinationen I-a, II-a und III-a). Zu jeder Betrachtungs- und Berechnungsmethode erfolgt abschließend eine Übersicht aller vier Kombinationen der jeweiligen Gruppe.

Ergänzt werden die Absorbanzspektren im roten Bereich in Kapitel 5.2.2 um theoretisch berechnete Spektren, die aus einer Kooperation mit GOEZ und NEUGEBAUER entstanden. Hier wurden verschiedene Szenarien berechnet, die die Beziehung zwischen dem roten Farbstoff Cy5.5 und Pyren als B ablaufen könnten.

5.2.1 Absorbanzspektren im Bereich der roten Farbstoffe

Wie im Kapitel 2.3.3 beschrieben, addieren sich in einem Spektrum die Absorbanzwerte aller vorhandener Komponenten, sofern keine Wechselwirkungen zwischen ihnen auftreten. Dies bedeutet, dass sich das Spektrum der Probe R_1NR_2 aus den Einzelspektren von R_1NN und NNR_2 zusammensetzen sollte, sofern keine Wechselwirkungen zwischen den beiden roten Chromophoren vorliegen. Daher werden zunächst für Kombination I-a[†] die Spektren von R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 in Abbildung 5.2 präsentiert und um das Summenspektrum aus R_1NN und NNR_2 ergänzt.

* Kombination II-b und II-c

[†] R_1 : Cy5.5, R_2 : Cy5.5, $R_{R_1 \leftrightarrow R_2}$: 4 bp

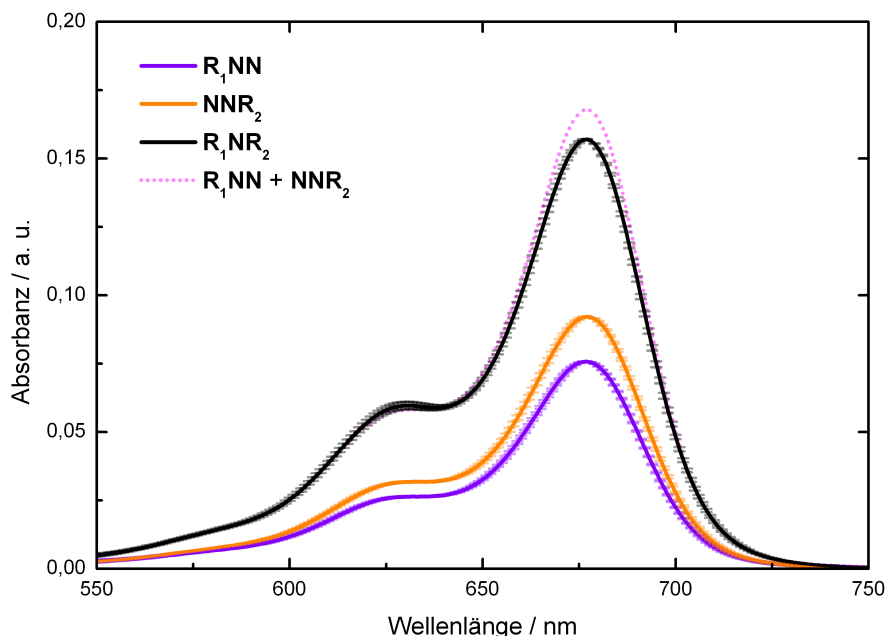


Abbildung 5.2: Absorbanzvergleich von R_1NN , NNR_2 und $(R_1NN + NNR_2)$ mit R_1NR_2 in Kombination I-a.

An der rechten Seite des Spektrums verhält sich das Summenspektrum analog zu R_1NR_2 . Es fällt jedoch auf, dass es am Hauptmaximum (~ 677 nm) etwa 7 % intensiver vorliegt als das Spektrum von R_1NR_2 , am Nebenmaximum (~ 630 nm) dagegen etwa 3 % niedriger.

Dieser Effekt erinnert an das Verhalten von exzitonischen Banden in homochromophoren Zweifarbstoffsystemen. Typisch dafür ist, ähnlich wie bei BOLLMANN *et al.* und SEIBT *et al.* (siehe Kapitel 2.5.1), eine Verstärkung der Seitenbanden, teils verbunden mit einer Abschwächung des Zentralmaximums. Da es sich in dieser Arbeit um ein Dreifarbstoffsystem handelt, ist es im folgenden Schritt interessant zu betrachten, wie sich die Absorbanz des Gesamtsystems verändert, sobald alle drei Farbstoffe vorliegen. Hierzu werden in Abbildung 5.3 die Spektren von NBN, R_1NR_2 und R_1BR_2 gegenübergestellt und um das Summenspektrum aus NBN und R_1NR_2 ergänzt.

Wie sich bereits in Tabelle 5.2 gezeigt hat, ist das Maximum von R_1BR_2 gegenüber R_1NR_2 bathochrom verschoben. Zudem liegt das Summenspektrum aus NBN und R_1NR_2 sehr genau auf dem Einzelspektrum von R_1NR_2 . Dies liegt darin begründet, dass B in diesem Bereich in einem so geringen Maß absorbiert, dass seine Absorbanz für künftige Betrachtungen vernachlässigt wird (siehe orangefarbenes Spektrum in Abbildung 5.3 und zusätzliches Spektrum im Anhang, Abbildung 11.1). Auch die Nacktstränge trugen in diesem Bereich nicht signifikant

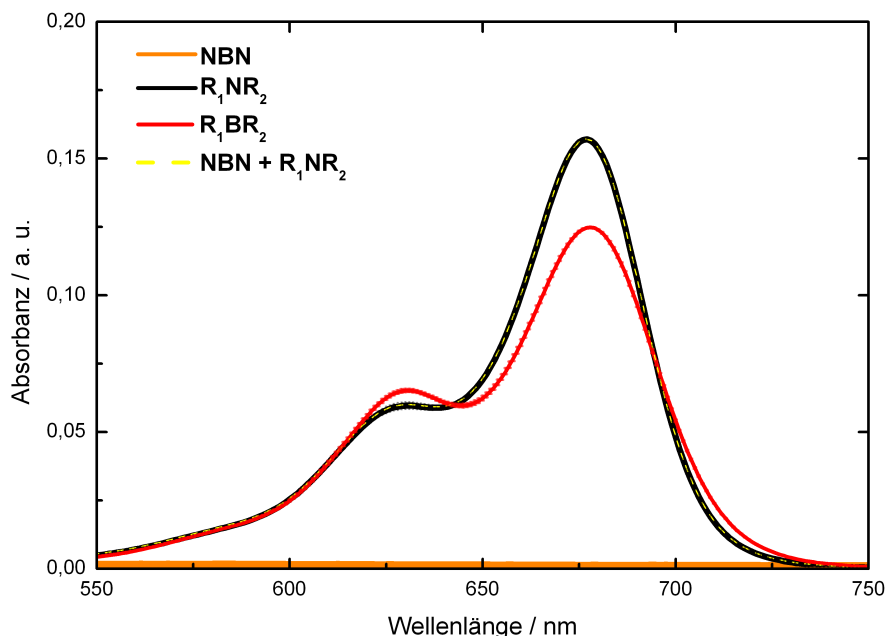


Abbildung 5.3: Absorbanzvergleich von NBN, R_1NR_2 und dem errechneten Spektrum von $(NBN + R_1NR_2)$ mit R_1BR_2 . Aus Gründen der Darstellung ist die orangefarbene Linie von NBN stark verbreitert dargestellt, da sie praktisch eine Nulllinie darstellt und sonst nicht sichtbar gewesen wäre.

zur GesamtabSORBANZ bei (s. Anhang, Abbildung 11.2), sodass sie ebenfalls für nachfolgende Berechnungen vernachlässigt werden.

Entscheidender und auffälliger ist jedoch, dass die Absorbanz von R_1BR_2 am Maximum um 21 % geringer ist als die von R_1NR_2 , im Gegensatz dazu aber im Nebenmaximum (~ 630 nm) ein Anstieg von R_1NR_2 auf R_1BR_2 um 9 % zu verzeichnen ist. Auch auf der bathochromen Seite liegt das R_1BR_2 -Spektrum über dem von R_1NR_2 . Es tritt also derselbe Effekt auf, der bereits in Abbildung 5.2 beobachtet wurde, nur deutlich stärker ausgeprägt.

Obwohl Pyren in diesem Wellenlängenbereich selber nicht absorbiert, scheint es dennoch einen Einfluss auf die roten Chromophore auszuüben. Daher zeigt Abbildung 5.4 zusätzlich das theoretische Summenspektrum aus BR_1 und BR_2 . Der Verlauf des neuen Summenspektrums folgt im Neben- und Hauptmaximum dem Verlauf des vorherigen, allerdings konstant um 8 % abgeschwächt und rotverschoben. Erst am bathochromen Ende geht $(R_1BN + NBR_2)$ in R_1BR_2 über. Um den Verlauf der Summenspektren besser nachvollziehen zu können, werden in Abbildung 5.5 alle Spektren der Proben präsentiert, die nur einen der roten Farbstoffe tragen.

Es ist deutlich sichtbar, dass es zu einer bathochromen Verschiebung und gleichzeitiger Abschwächung der Absorbanz der roten Farbstoffe kommt, sobald sich B mit in der Probe be-

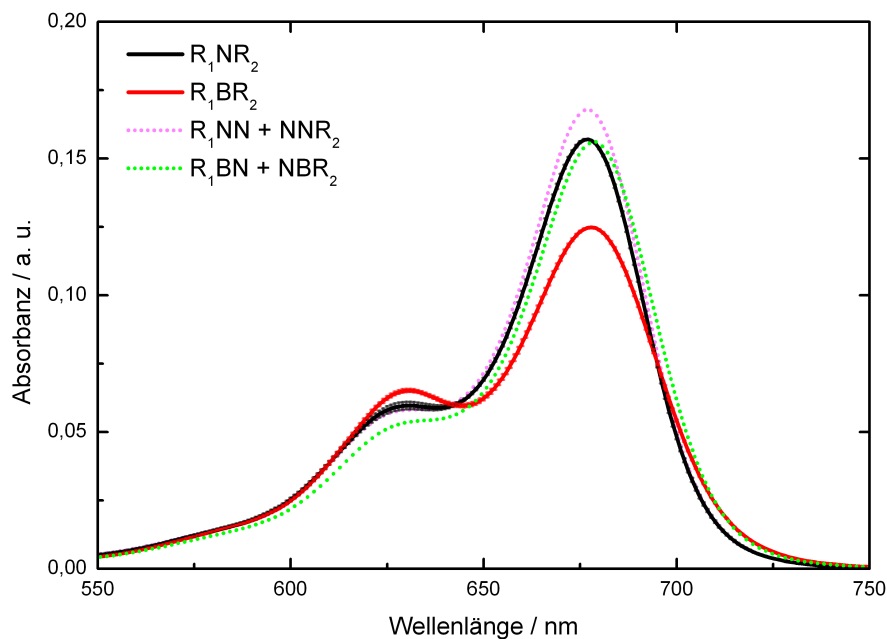


Abbildung 5.4: Absorbanzvergleich von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit den errechneten Spektren ($R_1NN + NNR_2$) und ($R_1BN + NBR_2$)

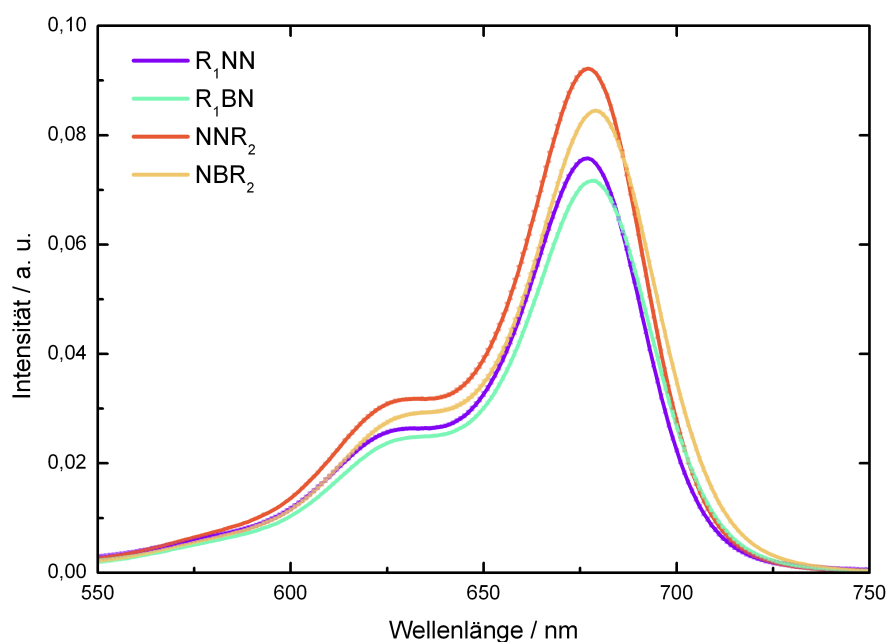


Abbildung 5.5: Einfluss von B auf das Absorbanzverhalten von R_1 und R_2 in Kombination I-a.

findet. Es sind somit die gleichen Effekte zu sehen, die in Abbildung 5.4 den aufsummierten Unterschied zwischen R_1NR_2 und ($R_1BN + NBR_2$) ausmachen.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen, dass die Absenkung des Hauptmaximums und die Verstärkung der Seitenbanden die größte Veränderung innerhalb der Proben darstellt. Da dieser Effekt in weiteren Kombinationen thematisiert wird, wird für ihn an dieser Stelle

der Begriff „Seitenbandeneffekt“ eingeführt. Die Bedingungen für sein Auftreten werden aus späteren Vergleichen aller Kombinationen hervorgehen.

Zunächst wird jedoch durch die Bildung von Differenzspektren auf eine deutlichere Darstellung der Unterschiede innerhalb einer Kombination, momentan noch immer Kombination I-a, eingegangen. Herangezogen werden hierfür lediglich die drei wichtigsten Spektren: R_1NR_2 , R_1BR_2 und $(R_1BN + NBR_2)$. Sie repräsentieren alle zuvor beobachteten Wechselwirkungen (in ansteigender Größe der beobachteten Effekte): die Wechselwirkung jeweils eines roten Farbstoffes mit Pyren, der beiden roten Farbstoffe untereinander und aller drei zusammen. Gebildet wurden die in Abbildung 5.6 gezeigten Daten, indem das R_1NR_2 -Spektrum mit mittlerer Effektgröße von allen drei abgezogen wurde. Für das Differenzspektrum $(R_1NR_2 - R_1NR_2)$ wird dadurch eine Nulllinie erhalten. Da die Absorbanz im Nebenmaxima in der Dreierkombination größer war als die von R_1NR_2 , sollte sich dies durch positive Anstiege des Differenzspektrums $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ bemerkbar machen.

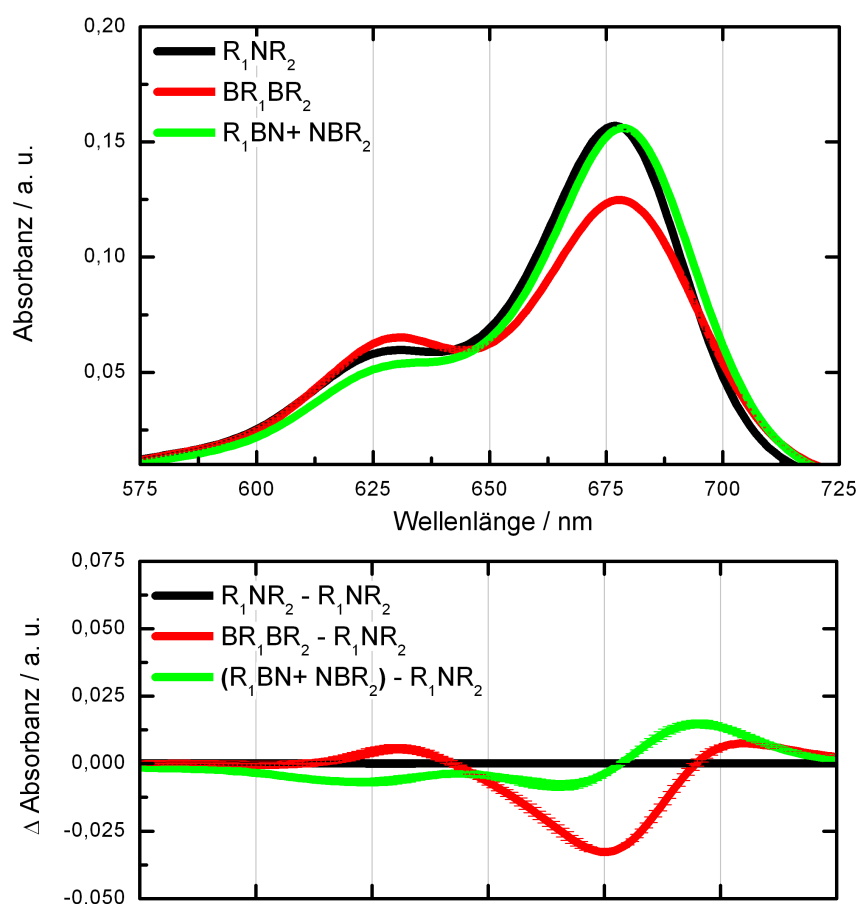


Abbildung 5.6: Originalwerte (oben) und daraus errechnete Differenzspektren (unten) der Kombination I-a.

Die Differenzspektren von $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ und $[(R_1BN + NBR_2) - R_1NR_2]$ unterstreichen die bereits zuvor erwähnten bathochromen Verschiebungen des Spektrums in Anwesenheit von Pyren, was insbesondere beim grünen Spektrum* dazu führt, dass der Unterschied auf der roten Seite des Spektrums sehr groß aussieht. Es ist zudem erkennbar, dass die positiven Anstiege in der Dreierkombination relativ symmetrisch liegen.

Um die reinen Größenordnungen der Unterschiede eindeutiger zu zeigen und sie im weiteren Verlauf besser mit den anderen Kombinationen vergleichen zu können, wurden die drei Originalspektren jeweils auf ihr Maximum normiert und auf eine gemeinsame Maximumwellenlänge sowohl in x-, als auch in y-Richtung verschoben, da es bei der folgenden Berechnung und Darstellung (Abbildung 5.7) der Differenzspektren lediglich auf Relations- und nicht auf Absolutwerte ankommt. Die Verschiebungen der Spektren werden zwar dadurch außer Acht gelassen, aber sie konnten in den Spektren zuvor bereits deutlich gezeigt werden.

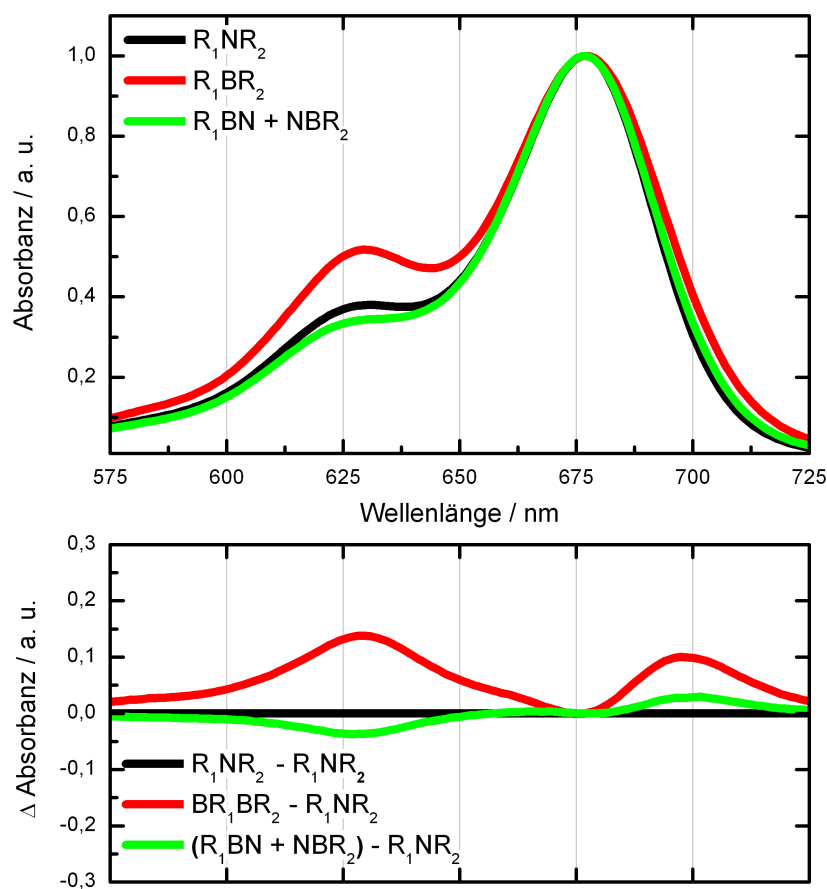


Abbildung 5.7: Normierte Differenzspektren der Kombination I-a. Die oben dargestellten normierten Spektren wurden zudem auf ein gemeinsames Wellenlängenmaximum gebracht.

* im Vergleich zu Abbildung 5.4 zur besseren Darstellung hier nicht mehr gestrichelt

Diese Abbildung verdeutlicht, dass die Anstiege zu beiden Seiten des Maximums nur in der Dreierkombination stark ausgeprägt sind, wenn auch durch diese Art der Normierung nicht mehr symmetrisch.

In der bis jetzt betrachteten Kombination lagen die beiden homochromophoren roten Farbstoffe 4 bp auseinander und Pyren mit jeweils 2 bp Abstand dazwischen. Alle drei Farbstoffe bleiben in der folgenden Betrachtung der Kombination II-a gleich, der Abstand zwischen ihnen wird allerdings auf 10 bp zwischen R_1 und R_2 vergrößert. B weist nun 5 bp Abstand zu beiden roten Farbstoffen auf. Durch die Anordnung lässt sich untersuchen, ob eine größere Distanz das Ausmaß des Seitenbandeneffektes beeinflusst.

Hierzu werden die Spektren von R_1NR_2 und R_1BR_2 sowie das Summenspektrum aus R_1NN und NNR_2 miteinander verglichen (Abbildung 5.8). Auf die Darstellung des NBN-Spektrums wird verzichtet, da bereits gezeigt werden konnte, dass Pyren in diesem Bereich kombinationsunabhängig nicht absorbiert.

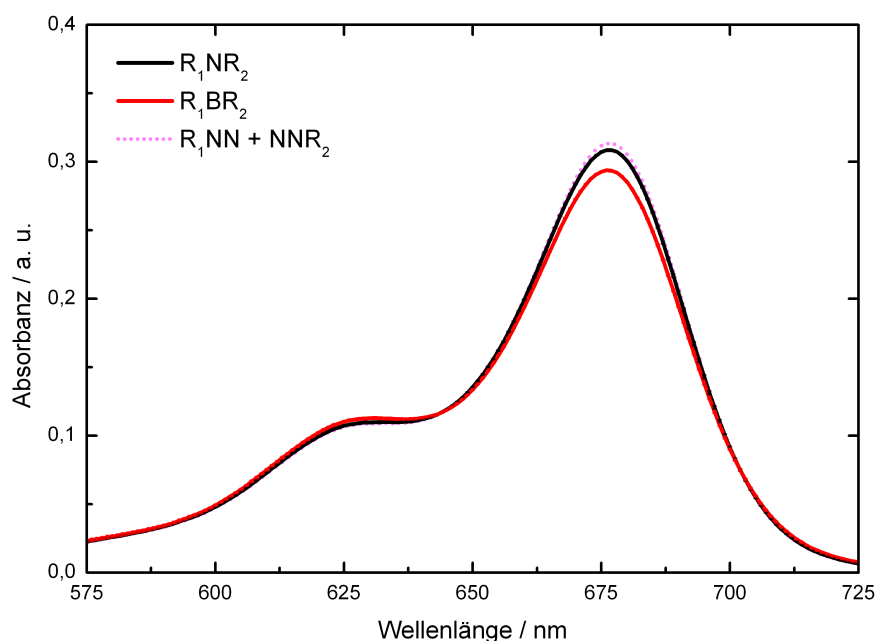


Abbildung 5.8: Absorbanzspektren von R_1NR_2 , R_1BR_2 und dem Summenspektrum aus ($R_1NN + NNR_2$) der Kombination II-a.

Der zuvor beobachtete Seitenbandeneffekt tritt auch in dieser Anordnung der Farbstoffe auf, allerdings sehr viel schwächer ausgeprägt als in der vorherigen Kombination: In Relation zu R_1NR_2 liegt R_1BR_2 im Hauptmaximum um etwa 5 % reduziert vor, das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) etwa 2 % höher. Im Nebenmaximum drehen sich die Verhältnisse wieder um: In Relation zu R_1NR_2 liegt R_1BR_2 um etwa 3 % erhöht vor und ($R_1NN + NNR_2$) etwa 1 %

reduziert. Ähnlich sieht das Ergebnis bei Hinzuziehen des Summenspektrums von R_1BN und NBR_2 aus (Abbildung 5.9):

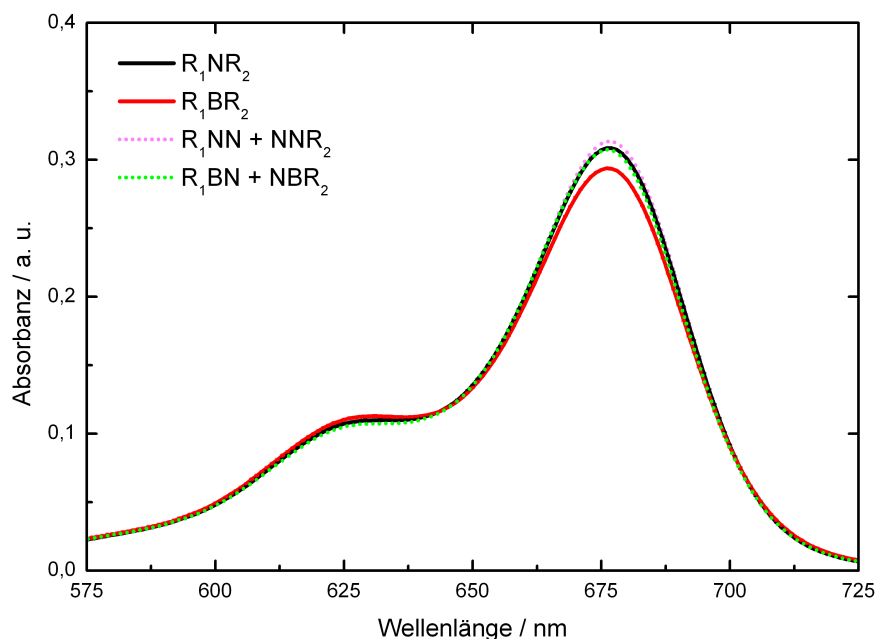


Abbildung 5.9: Vergleich der Absorbanzen von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit ihren dazugehörigen Summenspektren ($R_1NN + NNR_2$) und ($BR_1 + BR_2$).

Das Spektrum von ($R_1BN + NBR_2$) zeigt nahezu dieselben Intensitäten wie R_1NR_2 und verläuft im Hauptmaximum somit ebenfalls leicht abgeschwächt zu ($R_1NN + NNR_2$). Eine batho- oder hypsochrome Verschiebung ist in keinem der Spektren erkennbar. Ob Pyren die Einzelabsorbanzen der roten Farbstoffe dennoch beeinflusst, wird in Abbildung 5.10 gezeigt.

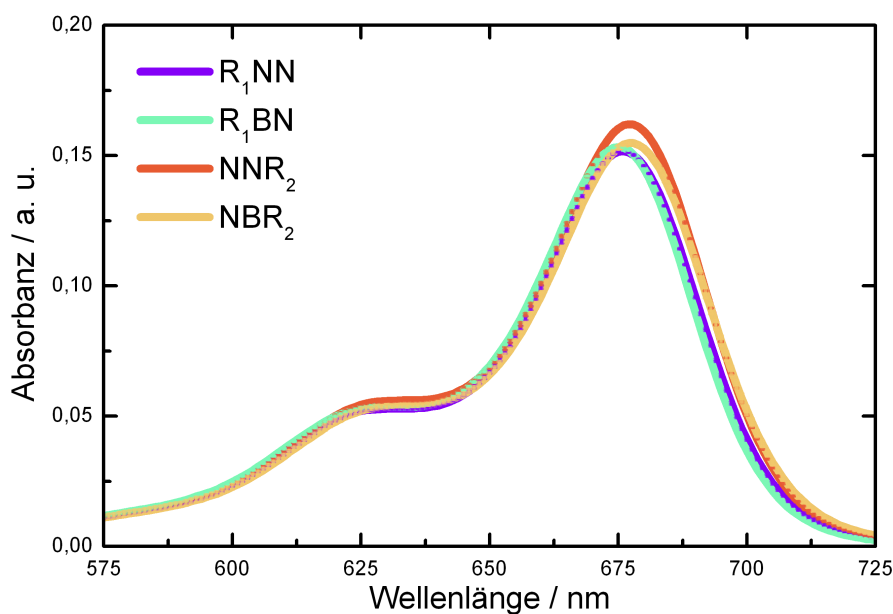


Abbildung 5.10: Einfluss von B auf die Proben R_1NN und NNR_2 der Kombination II-a.

Bei R_1NN sorgt die Anwesenheit des Pyrens für eine hypsochrome Verschiebung von etwa 1 nm, bei NNR_2 für eine bathochrome um etwa 0,5 nm. Dadurch heben sich beide Verschiebungen in etwa auf und es ergab sich für die Summe von $(R_1NN + NNR_2)$ und von $(R_1BN + NBR_2)$ kein merklicher Unterschied. Zudem liegt das Spektrum von NBR_2 4 % unter dem von NNR_2 . R_1BN zeigt sogar eine höhere Absorbanz als R_1NN , welche jedoch mit ~1 % im Bereich der Konzentrationsschwankungen liegt und praktisch vernachlässigt werden kann.

Damit die Unterschiede zwischen den drei wichtigsten Spektren deutlicher hervortreten, werden auch hier Differenzspektren gebildet. Da aufgrund der bereits gezeigten Spektren der Effekt klein sein wird, wird an dieser Stelle auf eine separierte Darstellung beider möglichen Berechnungsmethoden verzichtet und stattdessen in einer kombinierten Abbildung 5.11 dargestellt.

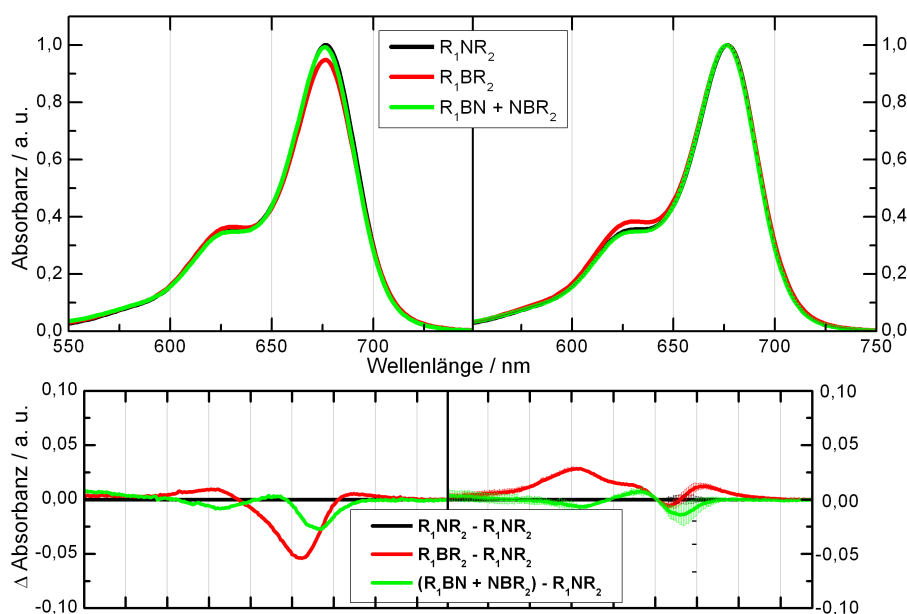


Abbildung 5.11: Differenzspektren von Kombination II-a. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dieselbe y-Skala wie in Abbildung 5.6 und 5.7 gewählt. **A:** Originalwerte; **B:** Differenzspektren der Werte aus A; **C:** auf das Maximum normierte Spektren, die zusätzlich auf eine gemeinsame Maximumwellenlänge verschoben wurden; **D:** aus C abgeleitete Differenzspektren.

Die Differenzspektren, die aus den Originalwerten gebildet wurden, zeigen so gut wie keinen Anstieg des roten Spektrums im positiven Bereich. Erst in den normierten Spektren wird ein solcher ersichtlich.

Zusammenfassend kann über Kombination II-a gesagt werden, dass der größere Abstand für konstant schwächer ausgeprägte Effekte sorgt, sowohl bei dem Seitenbandeneffekt der Absorbanzen zwischen Haupt- und Nebenmaximum als auch in der Abschwächung der Absorbanz

durch die Anwesenheit von Pyren. Zusätzlich sind die Verschiebungen der Maximumswerte kleiner und entgegengerichtet, sodass sich eine Aufhebung und keine Verstärkung ergibt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Absorbanzmessungen von Kombination III-a präsentiert. Hierbei handelt es sich bei den homochromophoren R-Farbstoffen um Alexa Fluor 790. Diese weisen wie bereits in Kombination I-a einen kurzen Abstand von 4 bp zueinander und somit je 2 bp zu Pyren auf. Im Gegensatz dazu unterscheiden sie sich jedoch energetisch im Sinne der *Up*- beziehungsweise diesem Fall *Downconversion* (siehe Gleichungen 1.4 und 1.3) um mehr als 3 %. In Abbildung 5.12 werden zunächst die erhaltenen Spektren von R_1NR_2 und R_1BR_2 gezeigt und mit der Summe der roten Einzelchromophorenspektren ($R_1NN + NNR_2$) verglichen.

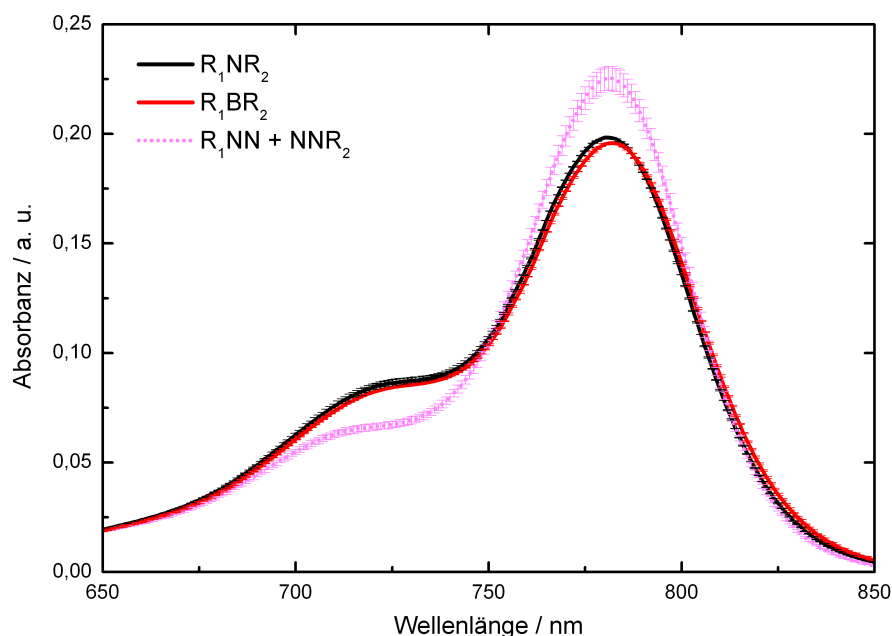


Abbildung 5.12: Vergleich der Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 mit dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) für Kombination III-a.

Auffällig ist, dass es in dieser Kombination zwar zu einem Seitenbandeneffekt kommt, dieser allerdings hauptsächlich bei gleichzeitiger Anwesenheit beider roten Chromophore auftritt. Pyren sorgt in der Dreierkombination lediglich für eine geringe Abschwächung des gesamten R_1NR_2 -Spektrums.

Ein sehr ähnlicher Trend zeichnet sich in Abbildung 5.13 bei der Hinzunahme des Summenspektrums von ($R_1BN + NBR_2$) ab: Die beiden Summenspektren sind nahezu deckungsgleich.

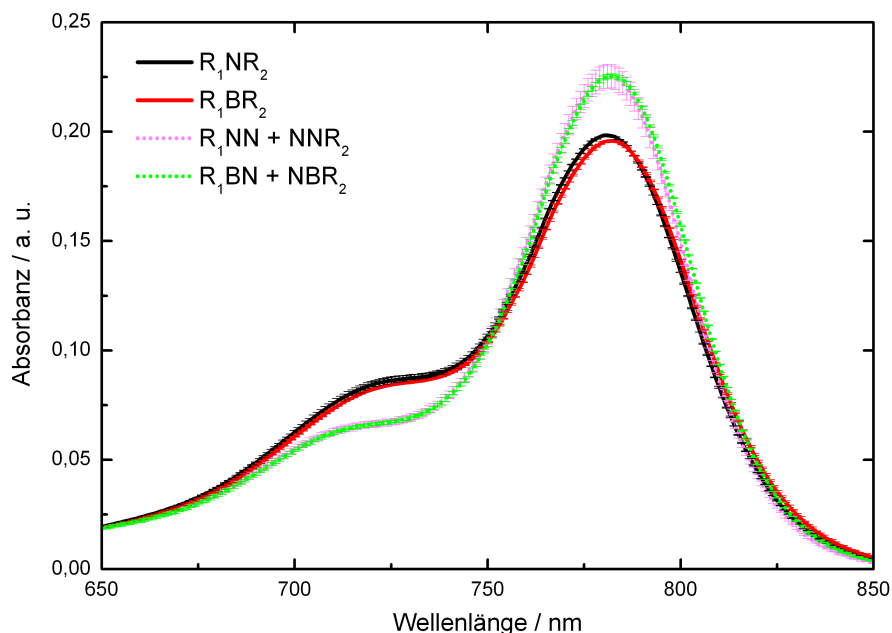


Abbildung 5.13: Vergleich der Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 mit dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) für Kombination III-a.

Da es nur bei der gleichzeitigen Anwesenheit beider R-Farbstoffe zu signifikanten Änderungen kommt, wird auf einen spektralen Vergleich der R- und BR-Proben verzichtet und stattdessen in Abbildung 5.14 direkt ein Vergleich der drei wichtigsten Spektren (R_1NR_2 , R_1NR_2 und ($R_1BN + NBR_2$)) mit ihren Differenzspektren gezeigt. Auf der linken Hälfte werden die unnormierten Spektren gezeigt, in der rechten Hälfte die auf der x,y -Skala normierten.

Beide ($R_1BR_2 - R_1NR_2$)-Differenzspektrum lassen einen kleinen Anstieg auf der bathochromen Seite des Maximums erkennen, ein Absinken des Maximums wie in den Proben der Gruppe I ist in den unnormierten Spektren jedoch nicht erkennbar.

Die bisherigen Spektren deuten darauf hin, dass es für das Auftreten eines signifikanten Seitenbandeneffektes entscheidend ist, dass die Farbstoffe wie in Gruppe I nah beieinander liegen und energetisch ähnlich sind. Allerdings handelte es sich bisher nur um homochromophore Paare. Um zu untersuchen, ob der Seitenbandeneffekt auch bei heterochromophoren Paaren der Gruppe I auftritt, wird als Beispiel Kombination I-b herangezogen*. In Abbildung 5.15 werden zunächst die erhaltenen Spektren von R_1NR_2 und R_1BR_2 gezeigt und mit der Summe der roten Einzelchromophorenspektren ($R_1NN + NNR_2$) verglichen.

* R_1 : Cy5.5, R_2 : Dy700

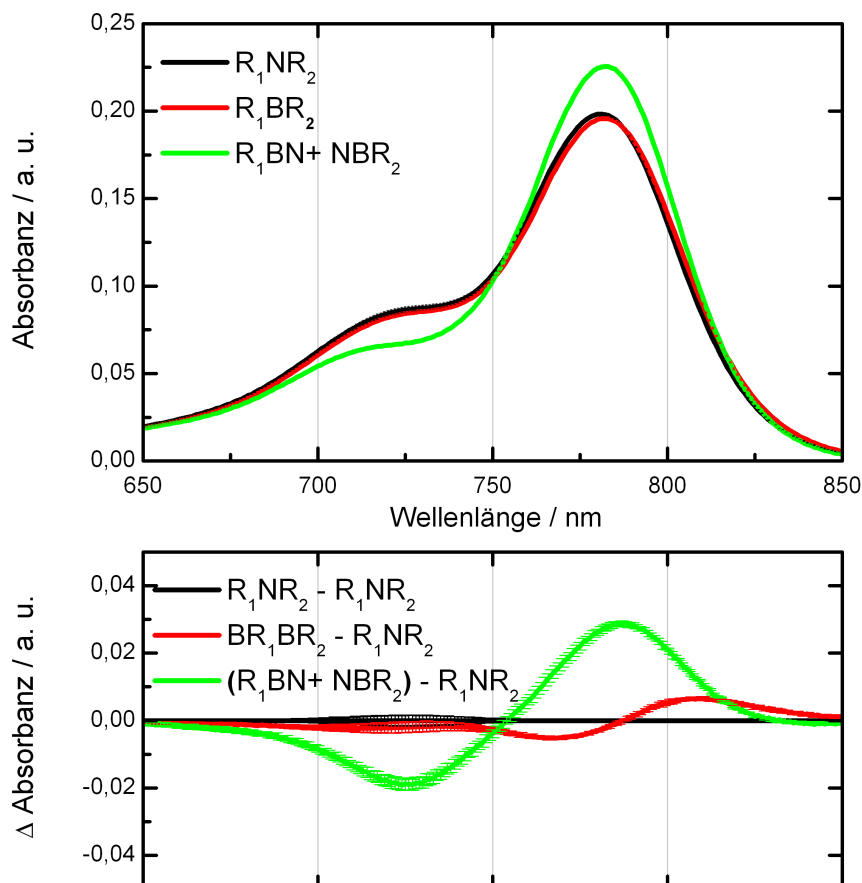


Abbildung 5.14: Vergleich der Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 mit dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) für Kombination III-a.

Auch wenn es sich bei den in Abbildung 5.15 gezeigten Spektren um eine additive Überlagerung von R_1NN und NNR_2 handelt und somit das Haupt- und Nebenmaximum nicht so klar zuzuordnen ist wie zuvor in den Kombinationen, ist eine Art Seitenbandeneffekt deutlich sichtbar: In der blauen Seitenbande weist die Dreierkombination die höchste Absorbanz auf (+16 % in Bezug auf R_1NR_2), das Summationsspektrum die niedrigste (-11 % in Bezug auf R_1NR_2). Ähnlich verhält es sich in der roten Seitenbande, allerdings insgesamt deutlich weniger intensiv*: In Relation zu R_1NR_2 liegt R_1BR_2 etwa 42 % höher und ($R_1NN + NNR_2$) um etwa 25 % tiefer. Im Gesamtmaximum verhält es sich dagegen genau umgekehrt: Im Verhältnis zu R_1NR_2 besitzt ($R_1NN + NNR_2$) ein um 2 % höheres Maximum, R_1BR_2 dagegen ein um 22 % tieferes. Bei Hinzunahme des Summenspektrums ($R_1BN + NBR_2$) ist kein signifikanter Unterschied erkennbar (Abbildung 5.16).

* Dies lässt die prozentualen Unterschiede folglich größer erscheinen.

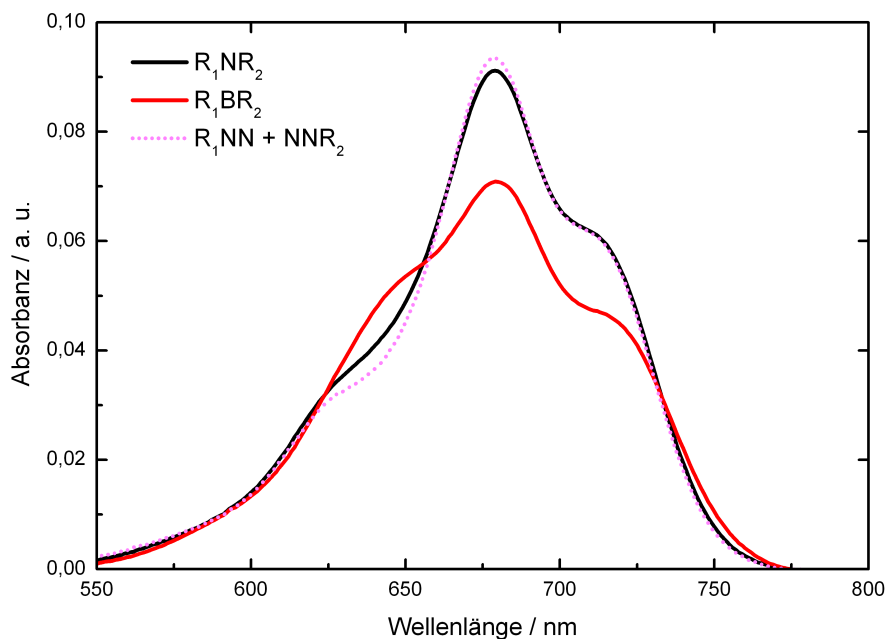


Abbildung 5.15: Vergleich der Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 mit dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) aus Kombination 3.

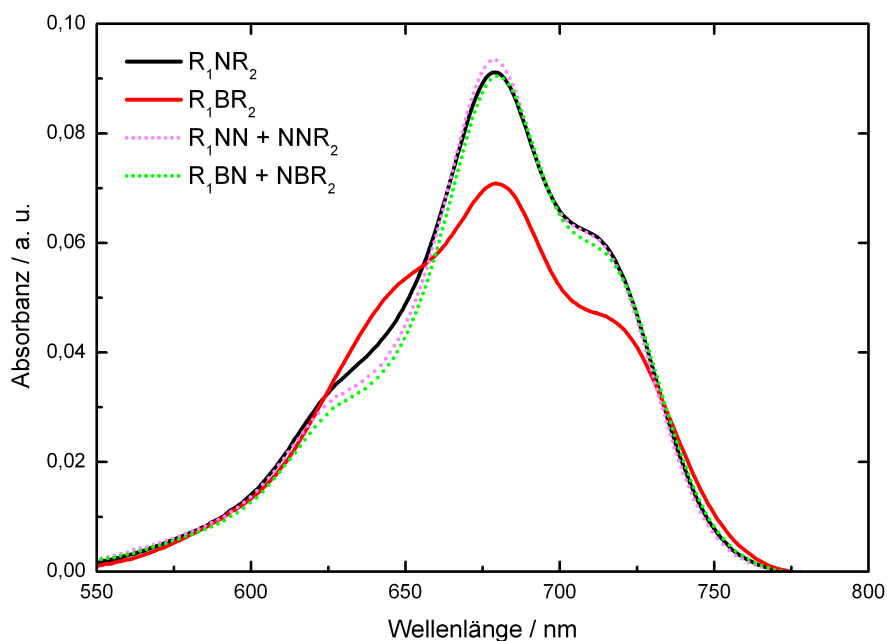


Abbildung 5.16: Vergleich der Absorbanzen von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit ihren dazugehörigen Summenspektren ($R_1NN + NNR_2$) und ($BR_1 + BR_2$).

Die hinzugefügte Kurve ($R_1BN + NBR_2$) folgt dem Absorbanzverlauf des vorherigen Summenspektrums ($R_1NN + NNR_2$), allerdings um 3-5 % reduziert. Im Hauptmaximum entspricht ihre Absorbanz annähernd der der R_1NR_2 -Probe, am bathochromen Ende geht sie hier nicht in R_1BR_2 über.

Um darzustellen, welchen Einfluss Pyren auf die einzelnen roten Farbstoffe hat und welchen Beitrag diese wiederum zum Gesamtspektrum aus Abbildung 5.16 leisten, zeigt Abbildung 5.17 die einzelnen R-/BR-Spektren (R_1NN , NNR_2 , R_1BN und NBR_2), die sich nach Messungen der Kombination 3 ergeben haben.

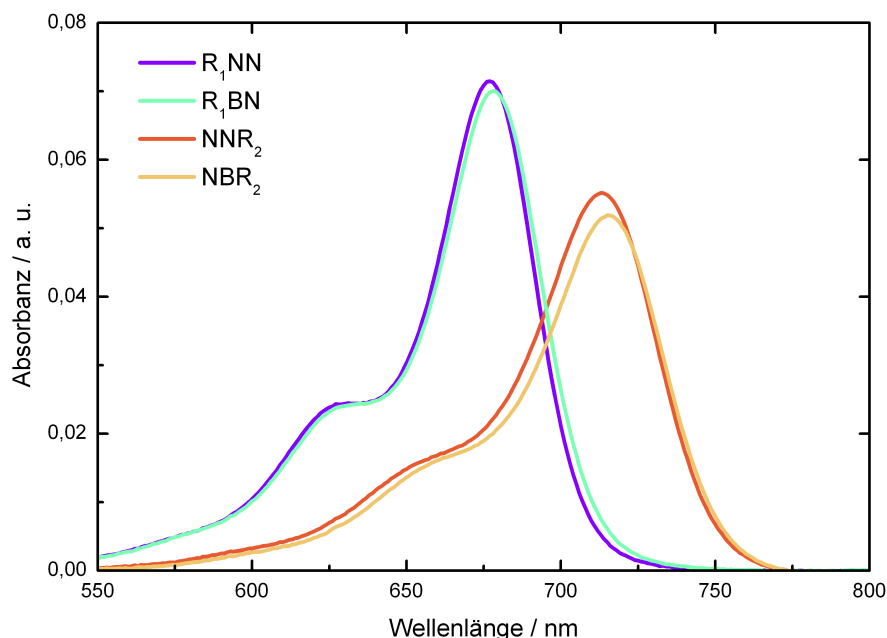


Abbildung 5.17: Einfluss von B auf die Proben R_1NN und NNR_2 der Kombination 3.

Es ist erkennbar, dass die Pyren-enthaltenen Proben eine bathochrome Verschiebung von 1-2 nm aufweisen und um 2 % (R_1NN zu BR_1), beziehungsweise 6 % (NNR_2 zu BR_2) schwächer absorbieren.

Wie bereits die Abbildungen 5.15 und 5.16 angedeutet haben, scheint der Seitenbandeneffekt in dieser Kombination wieder ähnlich stark ausgeprägt zu sein wie in Kombination 1. Aus diesem Grund zeigt die folgende Abbildung 5.18 zunächst nur die Originalwerte (oben, analog zu Abb. 5.16) und die sich daraus ergebenden Differenzspektren (unten).

Die Anstiege des roten Spektrum sind in dieser Darstellung nicht symmetrisch und die des grünen Differenzspektrums lediglich in Ansätzen im positiven Bereich erkennbar. Ob diese Beobachtungen der Art der Darstellung geschuldet sind oder auf Besonderheiten dieser Kombination beruhen, soll die folgende Abbildung 5.19 zeigen, in der die eben präsentierten Spektren wiederum auf ein gemeinsames Maximum normiert werden. Die Peaks in den Differenzspektren sind nun eindeutig nach positiv und negativ getrennt: Das rote Spektrum zeigt drei sehr große positive Anstiege, das grüne liegt durchweg bei Werten gleich oder kleiner Null vor.

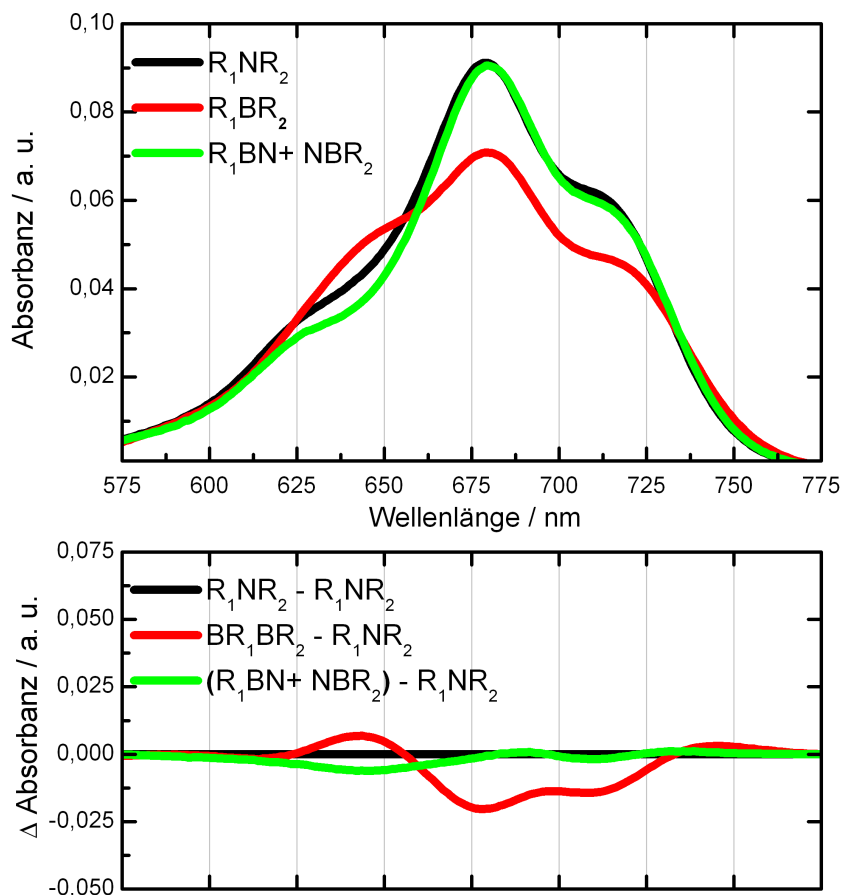


Abbildung 5.18: Original-Absorbanzwerte (oben) und daraus abgeleitete Differenzspektren nach Abzug von R_1NR_2 (unten) aus Kombination 3.

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwiefern ein Dreifarbstoffsystem miteinander wechselwirkt. Gefunden wurde in den vier vorstellten der zwölf vermessenen Kombinationen, dass es zwischen R_1 und R_2 zu Wechselwirkungen kommt, die einen Seitenbandeneffekt hervorrufen. Sind alle drei Farbstoffe in einer Probe präsent, wird dieser Effekt verstärkt. Er nimmt zudem ein signifikantes Ausmaß an, sobald alle drei Farbstoffe nur 4 bp voneinander entfernt liegen und im Sinne einer möglichen *Up-* oder *Downconversion* energetisch ähnlich sind.

Um die noch fehlenden fünf Kombinationen mit den drei bisher gezeigten vergleichen zu können, werden nur noch die drei wichtigsten Spektren R_1NR_2 , R_1BR_2 und (R_1BN und NBR_2) mit den daraus resultierenden Differenzspektren betrachtet, damit qualitative und quantitative Unterschiede zwischen allen Messreihen deutlicher werden. Dazu werden alle Kombinationen einer Gruppe in je einer Abbildung zusammengefasst.

Zu Beginn werden alle unnormierten Absorbanzspektren von R_1NR_2 , R_1BR_2 und ($R_1BN + NBR_2$) mit daraus entstehenden Differenzspektren gezeigt (Abbildungen 5.20 bis 5.22). Um

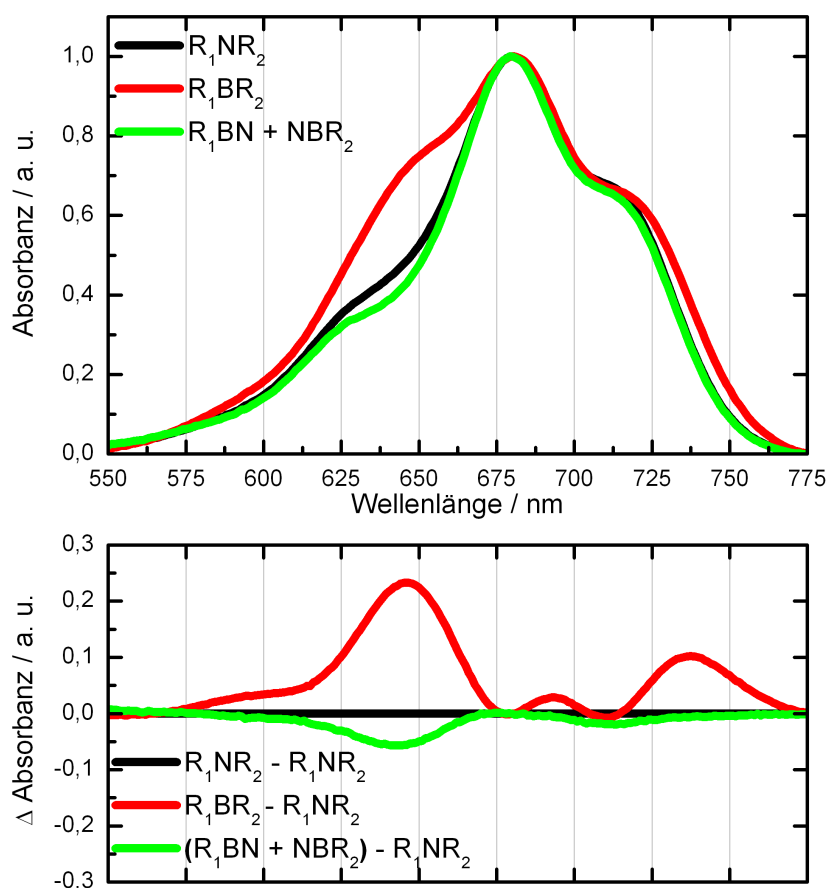


Abbildung 5.19: Normierte Differenzspektren der Kombination 3.

Oben: Die drei wichtigsten Spektren werden zunächst auf Eins normiert und anschließend auf ein gemeinsames Wellenlängenmaximum gebracht.

Unten: Die Probe R_1NR_2 wurde von allen oben gezeigten Spektren abgezogen.

das Vergleichen zu erleichtern wurde das R_1NR_2 -Spektrum auf Eins gesetzt und die beiden anderen dazu in Relation gesetzt. Bei mehreren Konzentrationen wurde auf das Maximum von R_1NR_2 der niedrigsten Konzentration normiert und der Mittelwert berechnet.

Im Vergleich aller drei Gruppen ist erkennbar, dass es nur in der Gruppe I zu deutlichen Abschwächungen kommt, sobald alle drei Farbstoffe präsent sind. Falls in den anderen beiden Gruppen der beschriebene Seitenbandeneffekt auftritt, liegt er stark abgeschwächt vor.

Um die Anstiege der $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ -Differenzspektren der auf das Maximum normierten Spektren aller Kombinationen quantitativ miteinander vergleichen zu können, werden sie in einer separierten Abbildung miteinander verglichen. Bei der Normierungsart der Originalspektren wurde sowohl in x- als auch y-Skala auf ein gemeinsames Maximum normiert, bei zwei optisch separierten Maxima auf zwei verschiedene. Dadurch gehen zwar die Informationen bezüglich

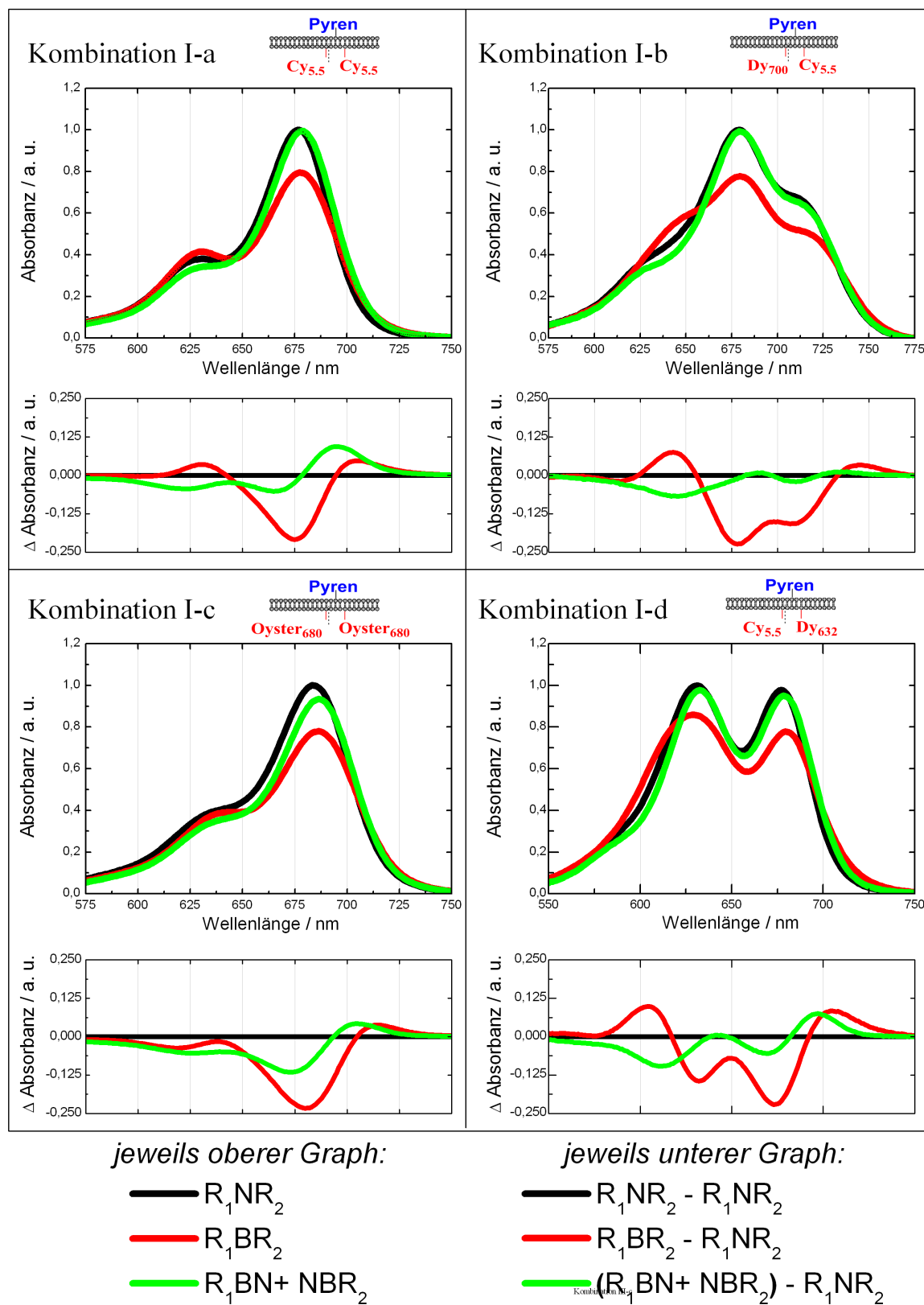


Abbildung 5.20: Darstellung der Rohdaten-Spektren (**oben**) und der dazugehörigen Differenzspektren (**unten**) aller Kombinationen der Gruppe I (R_1NR_2 auf Eins normiert)

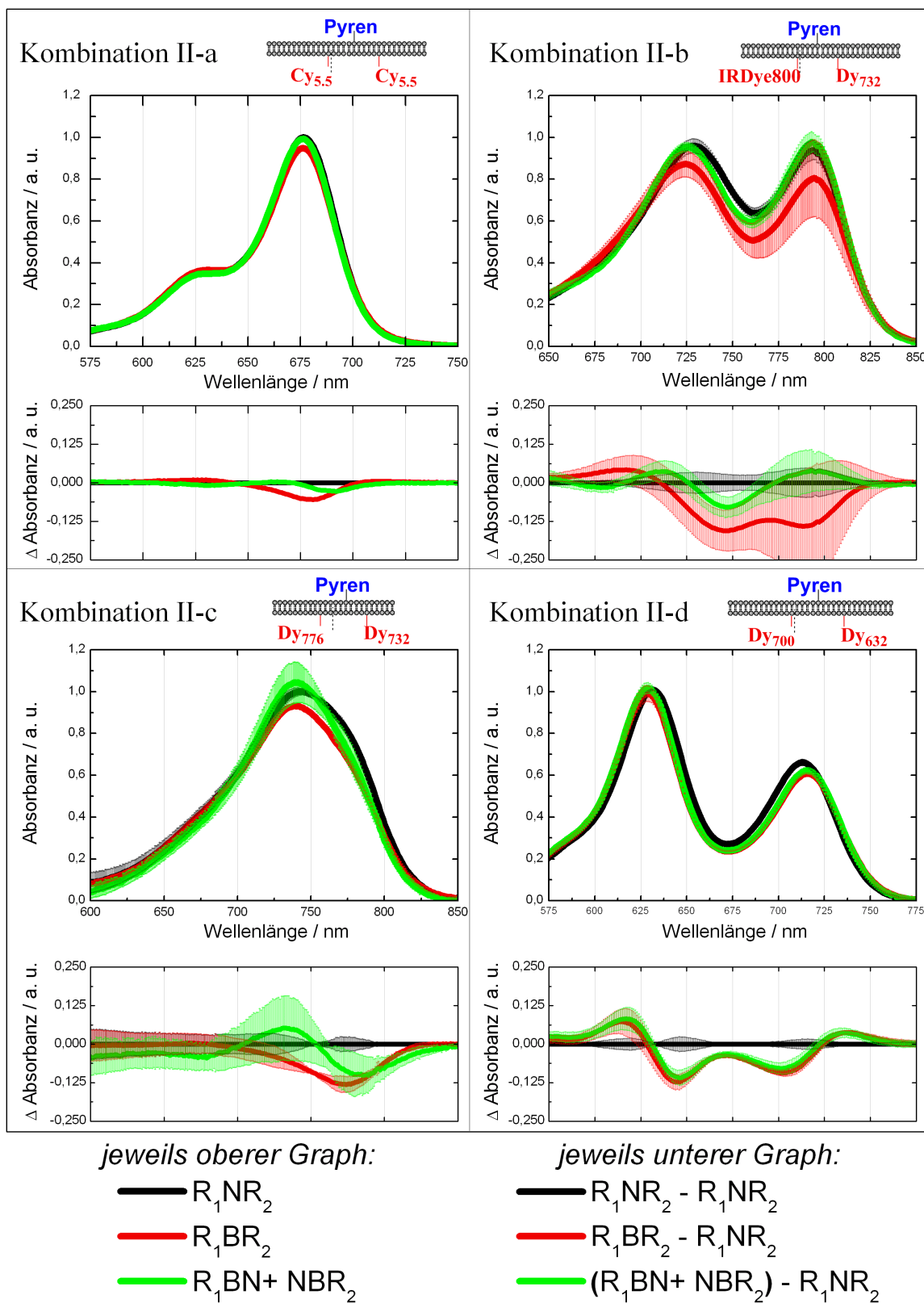


Abbildung 5.21: Darstellung der Rohdaten-Spektren (**oben**) und der dazugehörigen Differenzspektren (**unten**) aller Kombinationen der Gruppe II (R_1NR_2 auf Eins normiert)

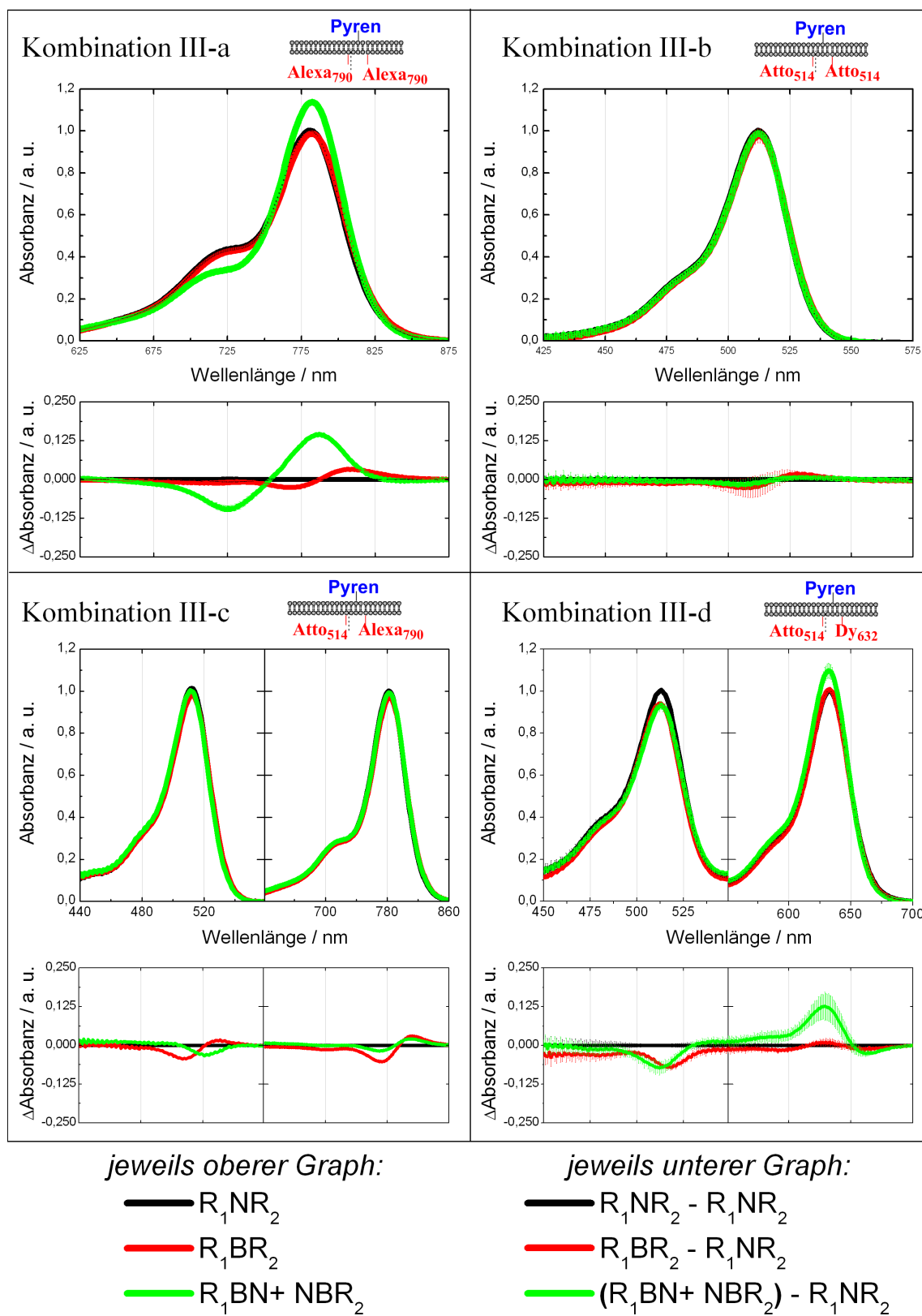


Abbildung 5.22: Darstellung der Rohdaten-Spektren (**oben**) und der dazugehörigen Differenzspektren (**unten**) aller Kombinationen der Gruppe III (R_1NR_2 auf Eins normiert)

der Maximumsabnahme und -verschiebung verloren, doch der zweite Effekt, das Verändern des Spektrums durch den Seitenbandeneffekt, tritt deutlicher hervor. Die Höhen der dadurch entstehenden Anstiege zu beiden Seiten der Spektren werden in den Abbildungen 5.23 bis 5.25 durch Pfeile repräsentiert: Der blaue Pfeil bezieht sich auf den Absorbanzunterschied von $(R_1NR_2 - R_1NR_2)$ auf $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ innerhalb des Bereiches der blauen Seitenbande. Der rote Pfeil bezieht sich auf denselben Anstieg, aber innerhalb des Bereiches der roten Seitenbande. Diese Bereiche wurden gewählt, da sich die beiden roten Farbstoffe hier am meisten unterscheiden. Gerade in den homochromophoren Kombinationen tragen jedoch beide Farbstoffe zur jeweiligen Absorbanz bei, sodass der Wert des blauen Pfeiles auch bei den heterochromophoren Kombinationen nicht mit dem alleinigen Beitrag von R_1 gleichzusetzen ist. Dies macht deutlich, dass eine Betrachtung der Werte zwischen diesen Bereichen ebenfalls nicht sinnvoll ist.

Begonnen wird in Abbildung 5.23 wiederum mit einer Darstellung der normierten Werte für Gruppe I, während in Abbildung 5.24 die normierten Ergebnisse der Gruppe II und in Abbildung 5.25 die der Gruppe III gezeigt werden.

Es ist bereits hier erkennbar, dass die Werte der Anstiege in der energetisch ähnlichen Kombinationen mit kleinem Abstand (Abbildung 5.23) stets beidseitig (blaue und roter Seitenbande) und deutlich größer ausgeprägt sind als bei den Kombinationen der Gruppen II und III.

Da die y-Skalen der beiden Abbildungen jedoch verschieden voneinander sind, lassen sich die unterschiedlichen Pfeil- und somit Peakhöhen der jeweiligen $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ -Differenzspektren anschaulicher in der sich anschließenden Abbildung 5.26 zusammenfassen. Dabei wurde in der Grafik die Bezeichnung „Pfeil“ verwendet, da sie sich bildhafter als der Begriff „Peakhöhe“ mit den Abbildungen 5.23 bis 5.25 verknüpfen lässt.

In dieser Darstellung zeichnen sich drei Trends ab: Zum einen liegen die Werte nur bei den Kombinationen, die einen Abstand $R_{R_1 \leftrightarrow R_2}$ von 4 bp aufweisen (Kombinationen I-a bis -d), über etwa 0,075. Der Maximalwert der anderen beiden Gruppen II und III beträgt lediglich 0,05. Bei diesen Werten handelt es sich zwar um keine absoluten Werte, die einem direkten physikalischen Wert entsprechen, doch kann das beobachtete Verhalten der Proben auch durch Relativwerte auf einer quantitative Basis verglichen werden.

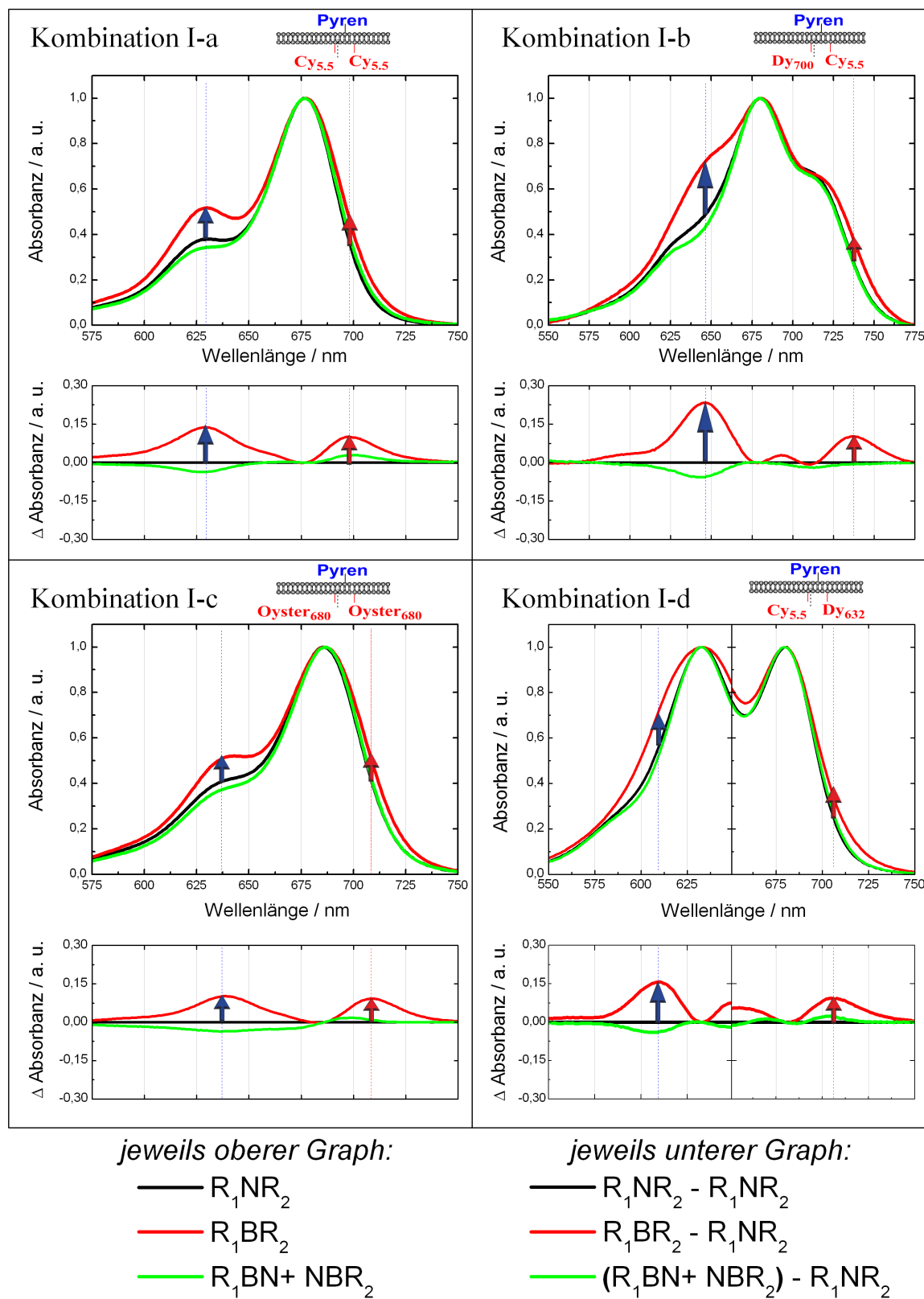


Abbildung 5.23: Darstellung der auf x- und y-Skala normierten Originalspektren (**oben**) und der sich daraus ergebende Differenzspektren (**unten**) der Gruppe I.

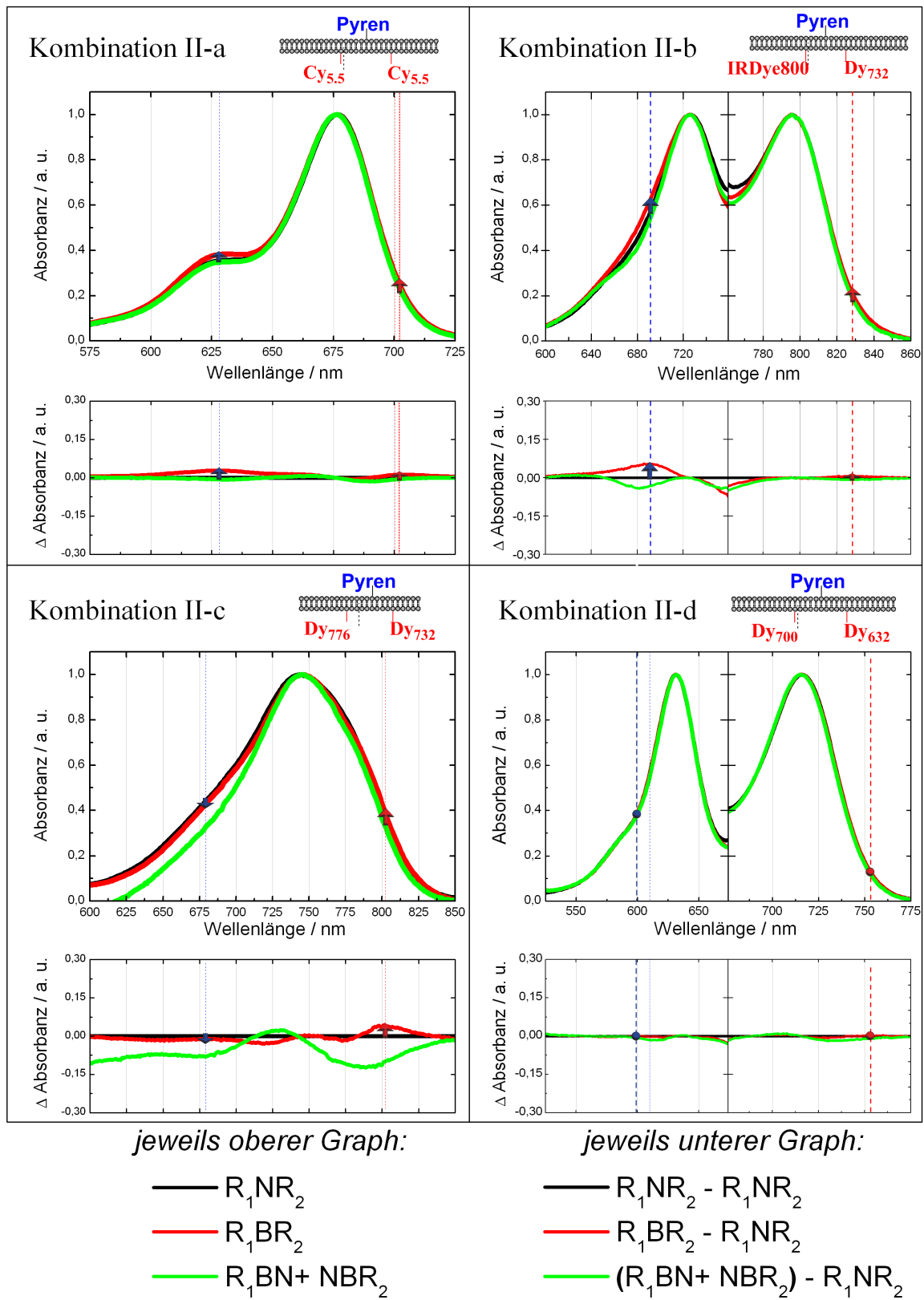


Abbildung 5.24: Darstellung der auf x- und y-Skala normierten Originalspektren (**oben**) und der sich daraus ergebende Differenzspektren (**unten**) der Gruppe II.

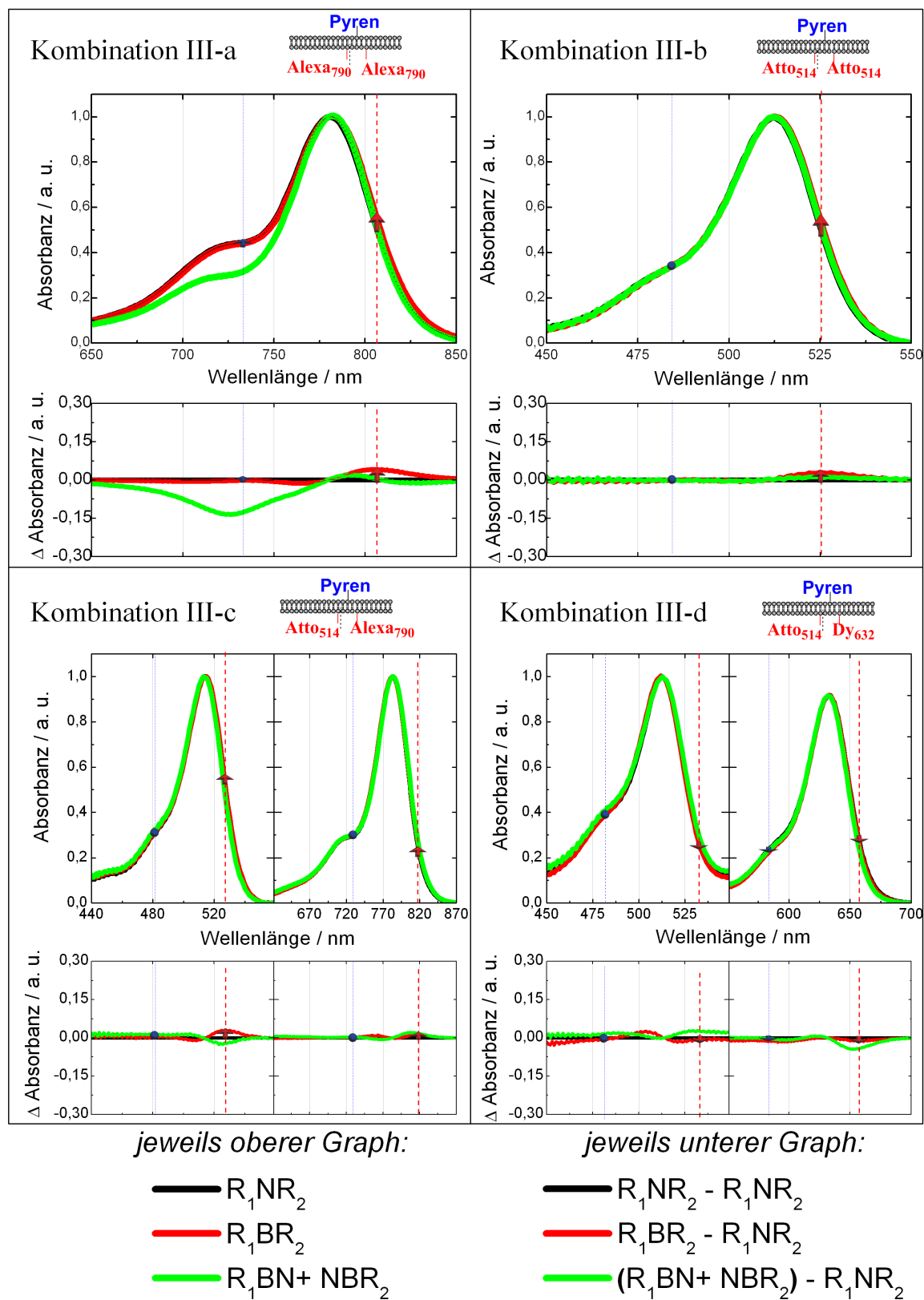


Abbildung 5.25: Darstellung der auf x- und y-Skala normierten Originalspektren (**oben**) und der sich daraus ergebende Differenzspektren (**unten**) der Gruppe III.

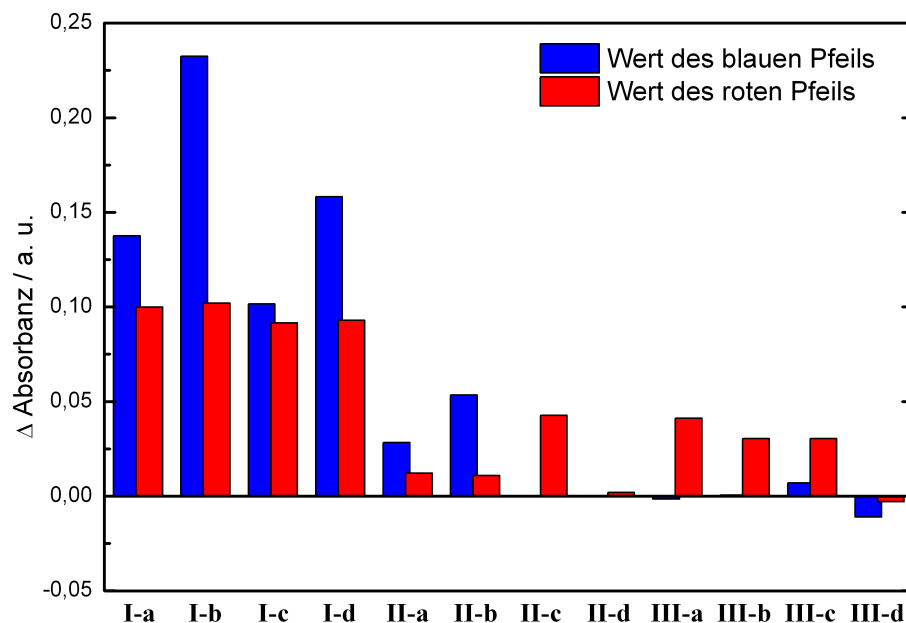


Abbildung 5.26: Zusammenfassung der in Abbildung 5.23 bis 5.25 durch Pfeile repräsentierten Peakhöhen aus den jeweiligen Differenzspektren. Unter den Kombinationsnummern befindet sich in Klammern die jeweilige Anzahl der Nukleotide zwischen R_1 und R_2 .

Es ist auch erkennbar, dass in Gruppe I die Werte der blauen Pfeile besonders hoch sind, wenn sich R_1 und R_2 unterscheiden (Kombinationen I-b und -d). Zudem ist auffällig, dass Pfeilhöhen der Proben der Gruppe III, wenn es zu einem Anstieg kommt, nur auf der roten Seite erscheinen.

Die bisherigen Normierungen wurden stets auf ein lokales Maximum bezogen. Dies entstand allerdings in vielen Fällen durch eine Überlagerung der jeweiligen R_1 NN und NNR_2 -, beziehungsweise R_1 BN und NBR_2 -Spektren. Um den Einfluss des Partners zu minimieren, müssen die Spektren für jeweils einen der roten Farbstoffe berechnet werden. Um beispielsweise das Verhalten von R_1 gegenüber R_2 , Pyren und beiden gleichzeitig zu betrachten, werden wieder drei Spektren miteinander verglichen und, wenn möglich, um den Anteil von R_2 subtrahiert. Dazu wird ein Spektrum aus (R_1NR_2 - NNR_2) und eines aus (R_1BR_2 - NBR_2) gebildet und mit R_1BN verglichen. Alle drei Spektren werden wiederum in x- und y-Skala auf das Maximum normiert. Ebenso wird für R_2 verfahren: Hier werden (R_1NR_2 - R_1NN) und (R_1NR_2 - R_1BN) mit NBR_2 verglichen. Die Ergebnisse der Gruppe I werden in Abbildung 5.27 gezeigt, die der Gruppe II in Abbildung 5.28 und abschließend die Spektren der Gruppe III in Abbildung 5.29. Die Anstiege in den roten Partnerfarbstoff-bereinigten Differenzspektren ($'R_1BR_2' - 'R_1NR_2'$) werden jeweils immer durch Pfeile repräsentiert.

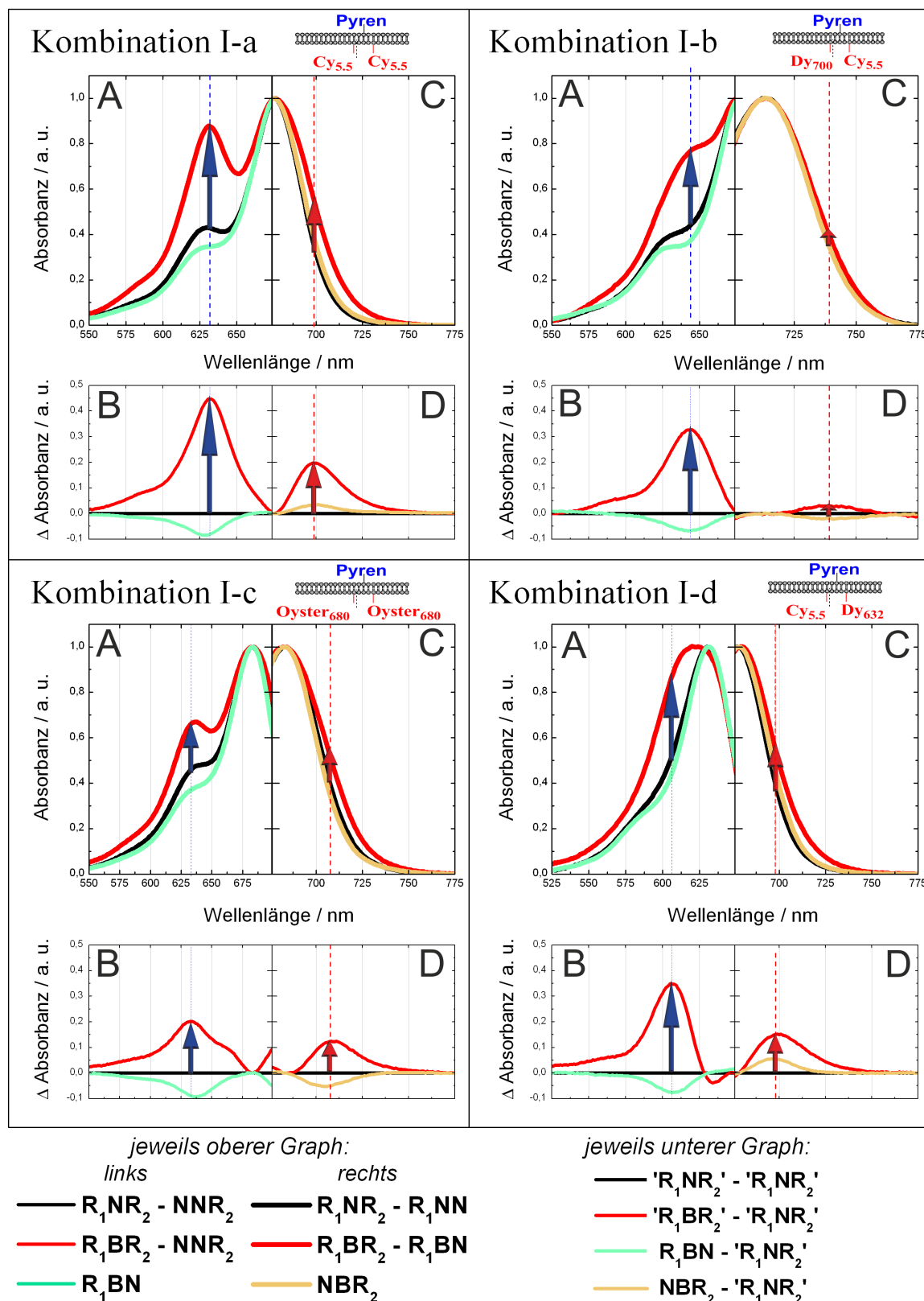


Abbildung 5.27: Darstellung der um den Partnerfarbstoff bereinigten und normierten Spektren für die Kombinationen der Gruppe I. Bei der Darstellung der Proben in Anführungszeichen in **B** und **D** handelt es sich um eine verkürzte Benennung der Partnerbereinigten Spektren aus **A** und **C**. **A**: um R_2 bereinigte Spektren ($R_1NR_2 - NNR_2$) und ($R_1BR_2 - NBR_2$) im Vergleich zu R_1BN . **B**: sich aus **B** ergebende Differenzspektren. **C**: um R_1 bereinigte Spektren ($R_1NR_2 - R_1NN$) und ($R_1BR_2 - R_1BN$) im Vergleich zu NBR_2 . **D**: sich aus **D** ergebende Differenzspektren.

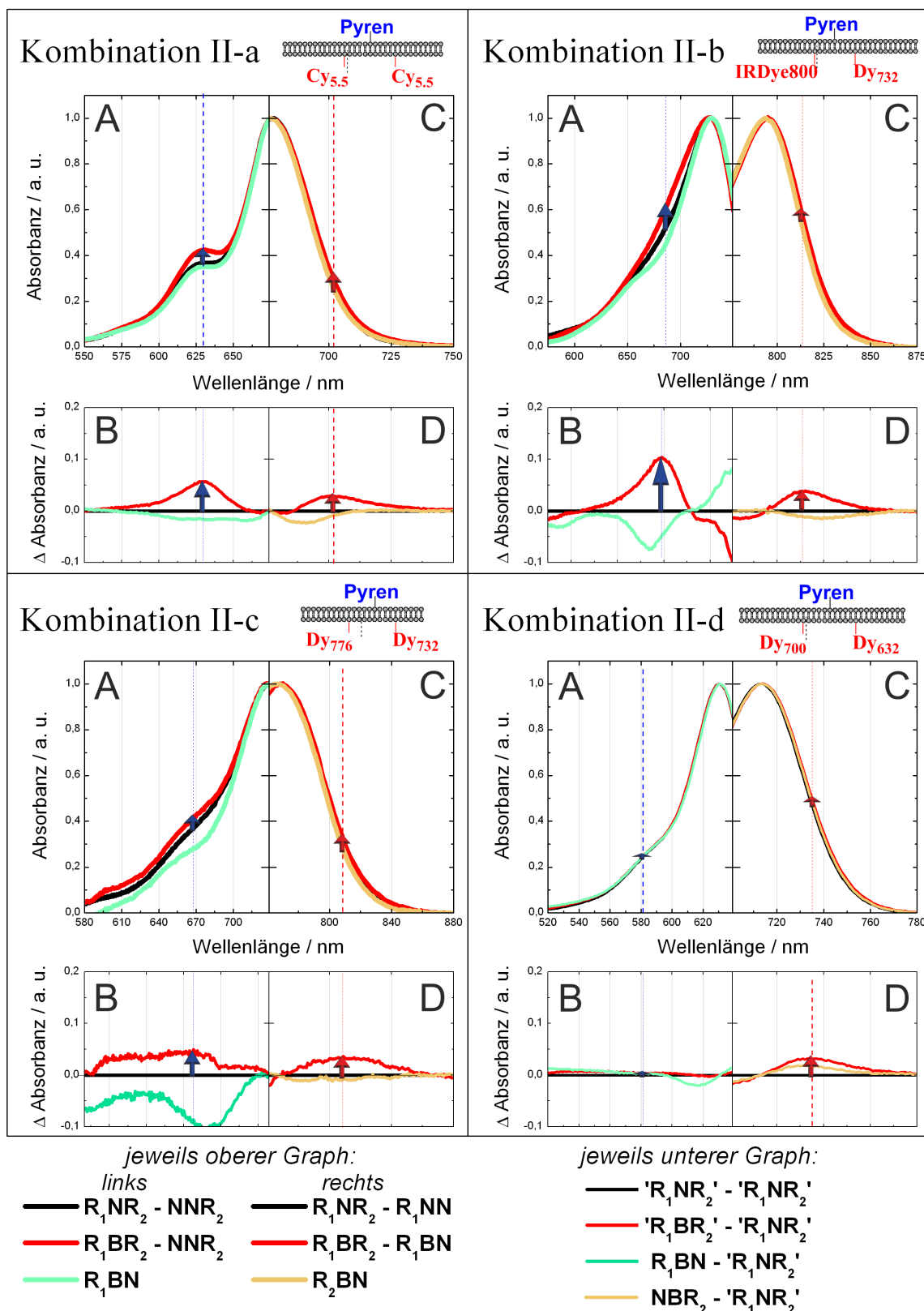


Abbildung 5.28: Darstellung der um den Partnerfarbstoff bereinigten und normierten Spektren für die Kombinationen der Gruppe II. Es wurden jeweils nur die Bereiche gezeigt, auf die normiert wurde. Bei der Darstellung der Proben in Anführungszeichen in **B** und **D** handelt es sich um eine verkürzte Benennung der Partner-bereinigten Spektren aus **A** und **C**. **A**: um R_2 bereinigte Spektren ($R_1NR_2 - NNR_2$) und ($R_1BR_2 - NNR_2$) im Vergleich zu R_1BN . **B**: sich aus **B** ergebende Differenzspektren. **C**: um R_1 bereinigte Spektren ($R_1NR_2 - R_1NN$) und ($R_1BR_2 - R_1BN$) im Vergleich zu NBR_2 . **D**: sich aus **D** ergebende Differenzspektren.

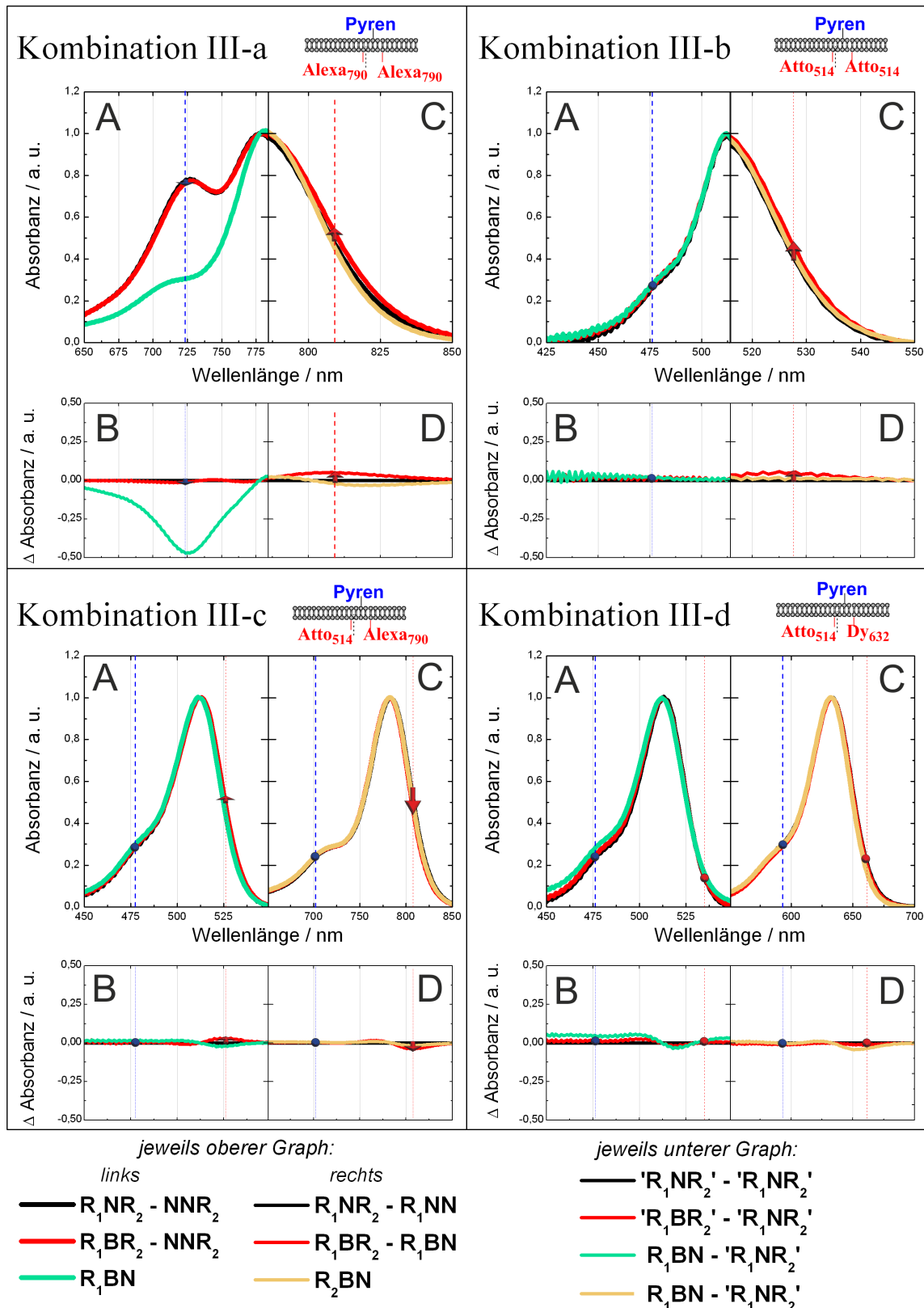


Abbildung 5.29: Darstellung der um den Partnerfarbstoff bereinigten und normierten Spektren für die Kombinationen der Gruppe III. Es wurden jeweils nur die Bereiche gezeigt, auf die normiert wurde. Bei der Darstellung der Proben in Anführungszeichen in **B** und **D** handelt es sich um eine verkürzte Benennung der Partner-bereinigten Spektren aus **A** und **C**. **A**: um R_2 bereinigte Spektren ($R_1NR_2 - NNR_2$) und ($R_1BR_2 - NNR_2$) im Vergleich zu R_1BN . **B**: sich aus **B** ergebende Differenzspektren. **C**: um R_1 bereinigte Spektren ($R_1NR_2 - R_1NN$) und ($R_1BR_2 - R_1BN$) im Vergleich zu NNR_2 . **D**: sich aus **D** ergebende Differenzspektren.

Die so erhaltenen Pfeilwerte deuten darauf hin, dass diese Art der berechneten Spektren zu anderen Verhältnissen führen. Um dieses nachzuprüfen, werden wiederum die Höhen der Pfeile aller Kombinationen miteinander verglichen (Abbildung 5.30). Die Werte sind wiederum in den

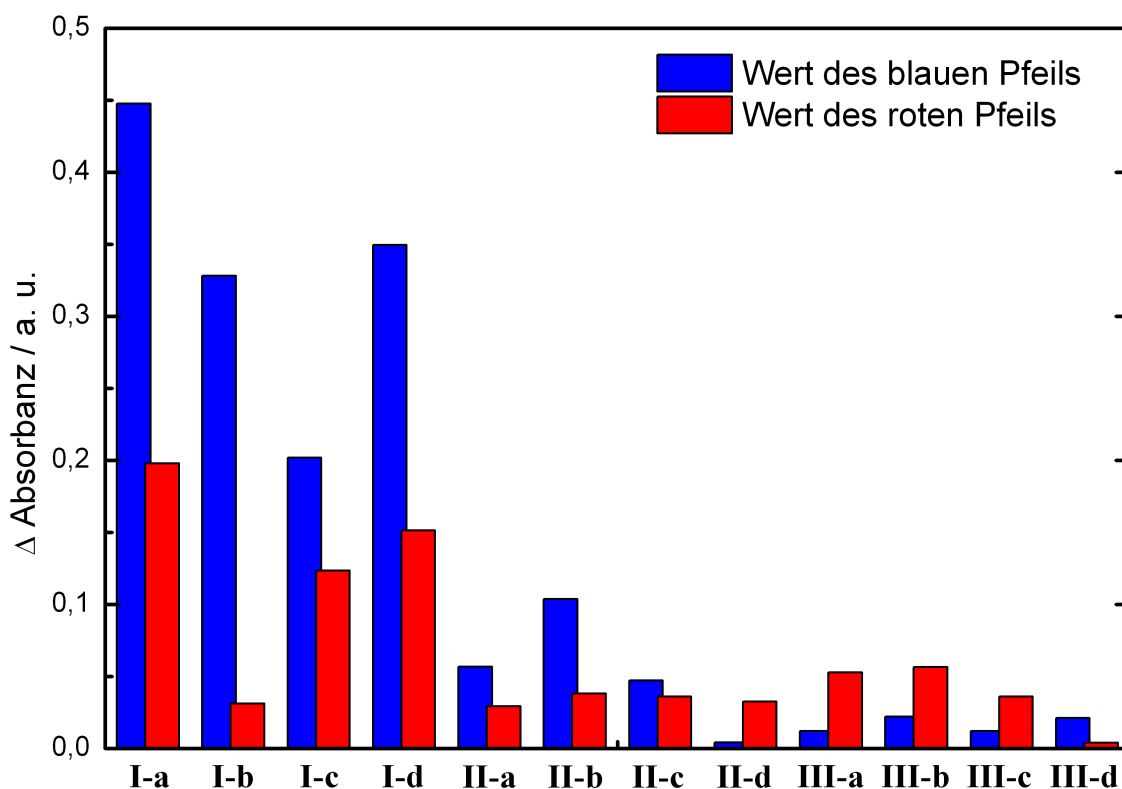


Abbildung 5.30: Zusammenfassung der in Abbildung 5.27 bis 5.29 durch Pfeile repräsentierten Peakhöhen aus den jeweiligen Differenzspektren. **Gruppe I:** räumlich nah, energetisch ähnlich; **Gruppe II:** energetisch ähnlich, räumlich entfernt; **Gruppe III:** räumlich nah, energetisch unterschiedlich

Kombinationen am höchsten, in dem R_1 und R_2 nah beieinanderliegen und energetisch ähnlich sind (Gruppe I) und sind speziell dort sehr hoch, in denen Cy5.5 anwesend ist (Kombinationen I-a, I-b und I-d). Einzig der rote Pfeilwert der Kombination I-b ist in Relation dazu sehr schwach und in der Größenordnung der Gruppe II. In dieser sind die blauen Anstiege ebenfalls stärker ausgeprägt als die roten, in der Gruppe III ist es dagegen umgekehrt.

In einer letzten Art der Darstellung der Wechselwirkungen zwischen allen drei Farbstoffen wird speziell auf die Wechselwirkungen der jeweiligen, möglichen Dimerkomponenten eingegangen. In dieser „Delta-Methode“ werden zunächst die Spektren für mögliche Dimer-Wechselwirkungen wie folgt berechnet:

$$\Delta D_{B,R_1} = R_1 B N - (N B N + R_1 N N - N N N) \quad (5.1)$$

$$\Delta D_{B,R_2} = NBR_2 - (NBN + NNR_2 - NNN) \quad (5.2)$$

$$\Delta D_{R_1,R_2} = R_1NR_2 - (R_1NN + NNR_2 - NNN) \quad (5.3)$$

Dies kann auf gleiche Art und Weise für das Dreifarbstoffsystem und eine mögliche Trimerbildung formuliert werden:

$$\Delta T_{B,R_1,R_2} = R_1BR_2 - (NBN + R_1NN + NNR_2 - 2NNN) \quad (5.4)$$

Daraus ergibt sich für den Anteil über diese Wechselwirkungen hinaus ein finales Spektrum aus:

$$\Delta F = \Delta T_{B,R_1,R_2} - (\Delta D_{B,R_1} + \Delta D_{B,R_2} + \Delta D_{R_1,R_2}) \quad (5.5)$$

Bei der Darstellung der sich so ergebenden Spektren wird wieder mit den Kombinationen begonnen, die einen Abstand von 4 bp zwischen R_1 und R_2 aufweisen und energetisch ähnlich sind (Gruppe I, Abbildung 5.31).

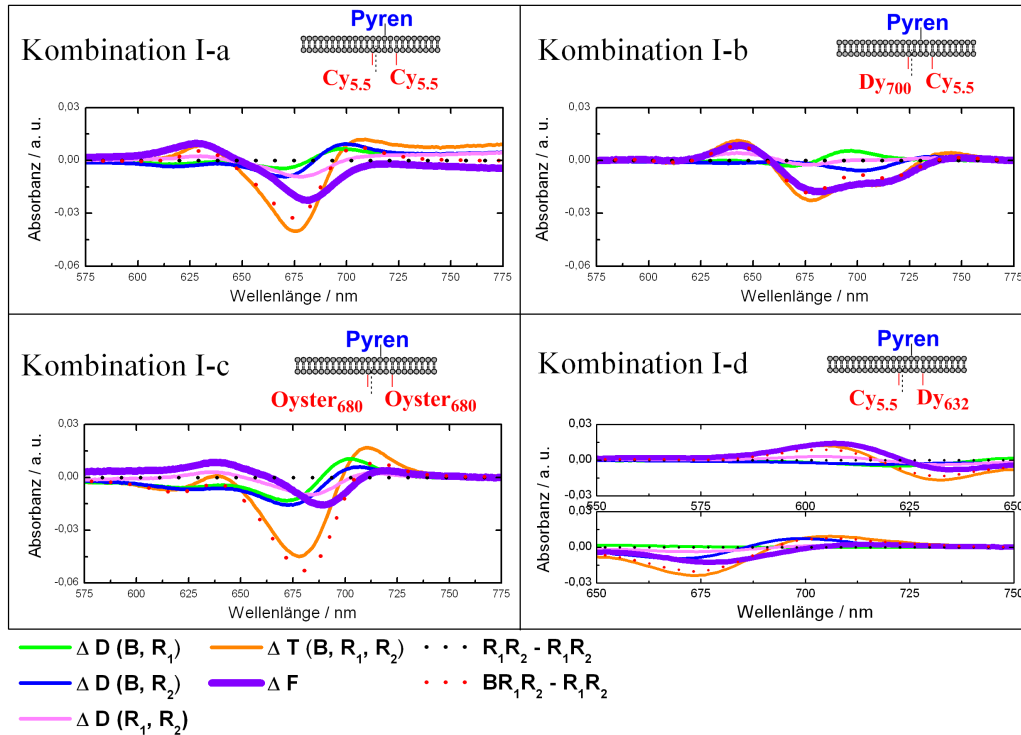


Abbildung 5.31: Darstellung der berechneten Spektren nach der „Delta-Methode“ für Gruppe I. Für die Berechnung der einzelnen Spektren siehe Gleichungen 5.1 bis 5.5. Zur spektralen Orientierung sind die Werte der Differenzspektren von $(R_1NR_2 - R_1NR_2)$ und $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ aus den normierten Originalspektren aus Abbildung 5.23 mit abgebildet.

Die einzelnen Spektren beinhalten in dieser Art der Darstellung auf den ersten Blick keine klaren Informationen. Im Vergleich zur folgenden Darstellung 5.32 der Kombinationen der Gruppe II und III (größerer Abstand, oben und energetisch unterschiedlich, unten) sind allerdings Unterschiede feststellbar.

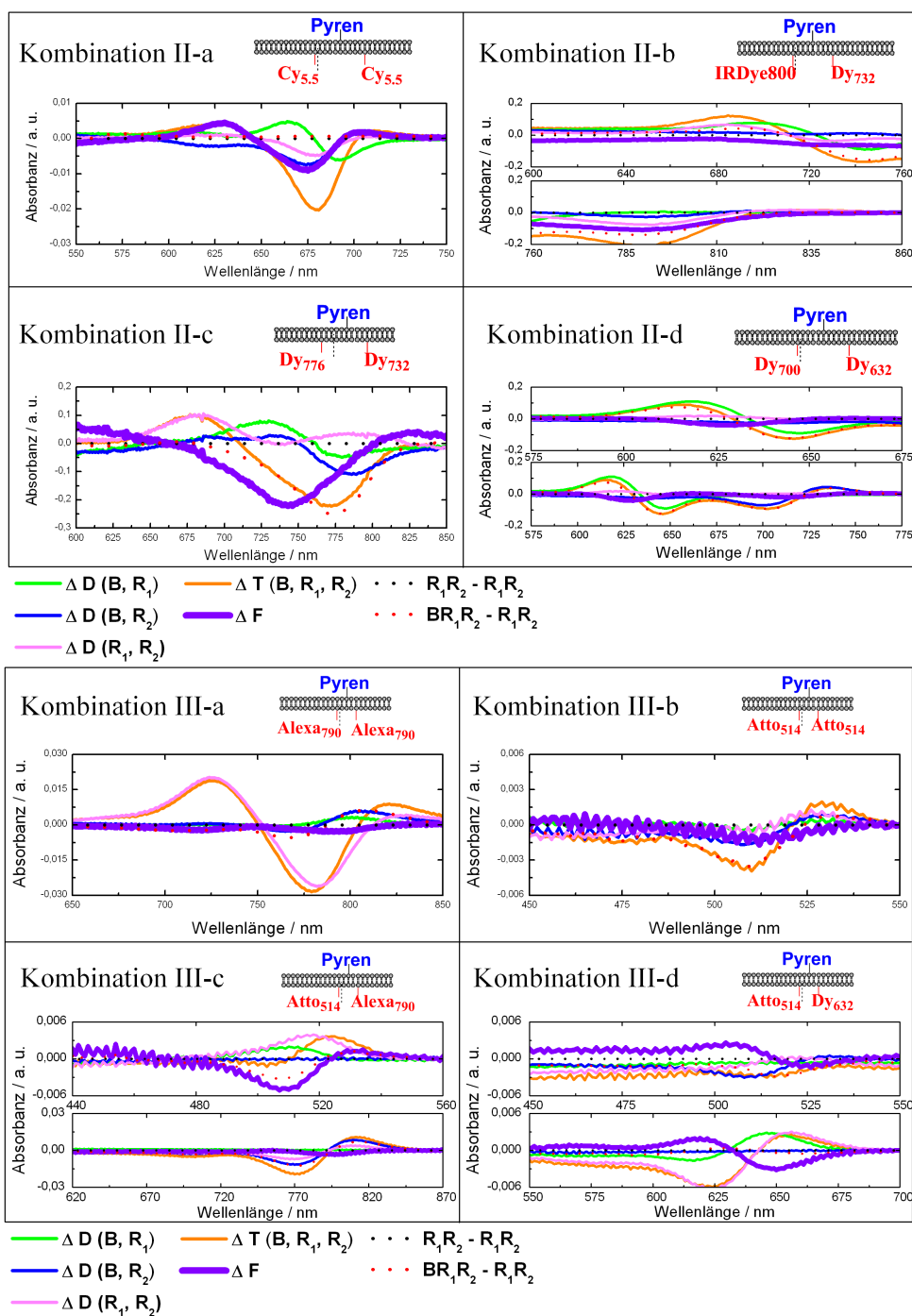


Abbildung 5.32: Darstellung der berechneten Spektren nach der „Delta-Methode“ für Gruppe II (oben) und III (unten). Für die Berechnung der einzelnen Spektren siehe Gleichungen 5.1 bis 5.5. Zur spektralen Orientierung sind die Werte der Differenzspektren von $(R_1NR_2 - R_1NR_2)$ und $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ aus den normierten Originalspektren aus Abbildung 5.24 und 5.25 mit abgebildet.

So sind in den Kombinationen der Gruppe I die finalen Spektren vor allem im Bereich der blauen Seitenbande stark ausgeprägt, was durch die ebenfalls mehr ausgeprägten positiven Werte für die mögliche Dimerwechselwirkung zwischen R_1 und R_2 und die mögliche Trimerwechselwirkung zwischen B, R_1 und R_2 bedingt ist. In den Kombinationen der Gruppe II und III sind keine eindeutigen Trends erkennbar, was eine Einteilung der Effekte nicht möglich macht.

Diese Darstellungsmethode bringt zwar keinen zusätzlichen, neuen Informationsgewinn, unterstützt jedoch eine bereits beobachtete Feststellung: Wenn alle drei Farbstoffe gleichzeitig vorliegen und energetisch ähnlich sind, werden die größten Effekte in den Proben hervorgerufen, in denen R_1 und R_2 nah beieinander liegen. Sie beruhen demnach auf den stärksten Wechselwirkungen.

5.2.2 Theoretisch berechnete Absorbanzspektren

Aus der Zusammenarbeit mit GOEZ und NEUGEBAUER* entstanden theoretische Absorbanzspektren, in denen untersucht werden sollte, inwiefern sich die Absorbanz der roten Farbstoffe der Kombination I-a bei unterschiedlicher Position des Pyrens verändert. Hierzu wurde von einer homochromophoren Probe mit Cy5.5 als R-Farbstoff ausgegangen.

Durchgeführt wurden die Rechnungen von GOEZ mit einer DFT-Methode (RI-BP86/TZVP) mittels TURBOMOLE.^[131] Cyanin-Moleküle wie Cy5.5 führen bei dieser Methode zwar bekanntermaßen zu Problemen,^[132] dennoch ist sie für qualitative Untersuchungen geeignet.

Zunächst wurden die Farbstoffe (Pyren, Cy5.5) einzeln ohne Linker im Vakuum geometrieoptimiert. Diese wurden einer Schwingungsanalyse und einer Gradientenbestimmung der jeweilig angeregten Zustände unterzogen. Die Ergebnisse wurden durch das Programm „Absorber“^[133] in die nachfolgenden vibronisch aufgelösten Spektren umgewandelt. Dieses Programm basiert auf der *Time-Dependent Overlap*-Methode von HELLER,^[134] welches als grundlegende Näherung das *Independent Mode Displaced Harmonic Oscillator*-Modell annimmt. Details hierzu werden im Kapitel 11.2.2 des Anhangs erläutert. Zusätzlich wurden Aggregate aus verschiedenen Kombinationen der einzelnen Farbstoffe gebildet. Diese wurden jedoch nicht geometrieoptimiert, sondern in verschiedenen Anordnungen frei im Raum platziert. Daher werden beispielsweise die Einflüsse der DNA oder des Lösungsmittels nicht berücksichtigt.

* Albrecht Goetz und Professor Johannes Neugebauer, Arbeitskreis für Theoretische Organische Chemie, Organisch-Chemisches Institut, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Im ersten Beispiel (Abbildung 5.33) wurden die Farbstoffe mit einem Winkel von 0° perfekt übereinandergelegt und weisen einen Abstand von jeweils 2 bp auf. Dies entspricht einem kleinen Abstand plus kleinen Winkel und somit einer nicht realistischen Verbindung beider räumlichen Systeme, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Zudem muss beachtet werden, dass die exzitonische Aufspaltung zweier Moleküle, deren Übergangsdipolmomente exakt parallel zueinander liegen, sich automatisch nicht mehr auf beiden Seiten des Maximums befindet, sondern es zu einer Verschiebung des Gesamtspektrums kommt (vergleiche Abbildung 2.6, Seite 21). Die errechneten Spektren simulieren das Absorbanzverhalten von R alleine, für R zusammen mit Pyren, für beide R zusammen und für die Dreierkombination. Da es sich um theoretische Proben handelt, wird auf die bisherige Bezeichnung verzichtet und stattdessen zu einer verkürzten Nomenklatur übergegangen*.

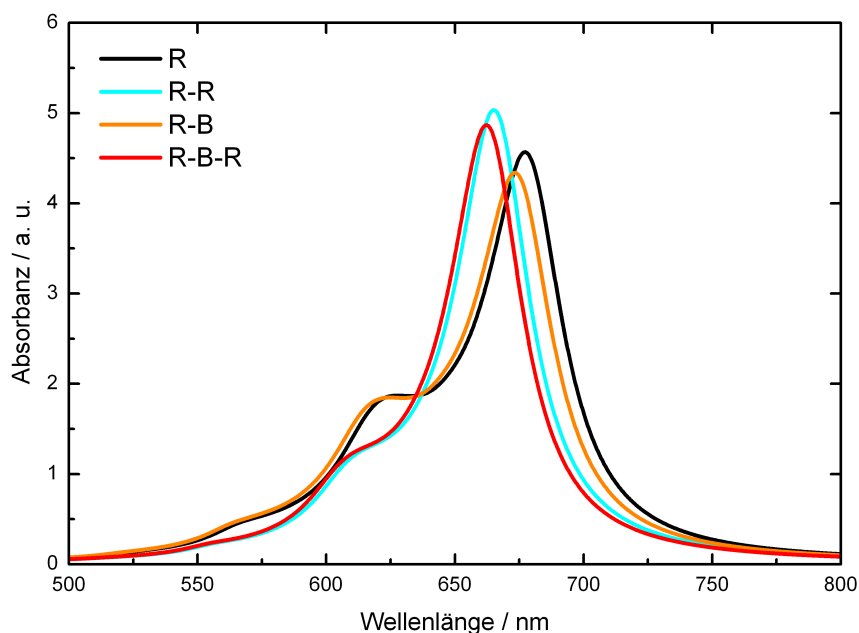


Abbildung 5.33: Vibronische Roh-Spektren von R, R-R, R-B und R-B-R.

Pyren sorgt für eine Verringerung der jeweiligen Gesamtabsoorbans und verhält sich damit analog zu den praktisch erhaltenen Absorbanspektren (vgl. beispielsweise Abbildung 5.5, Seite 69). Allerdings kommt es hier zu stärkeren Veränderungen, wenn der zweite Farbstoff dazukommt und unterstützt damit die Ergebnisse von SEIBT *et al.*^[75] Beim Zusammentreffen beider roten Farbstoffe verschwindet zudem die hypsochrome Schulter.

* R_1/R_2 : R, R_1NR_2 : R-R, BR_1/BR_2 : R-B, R_1BR_2 : R-B-R

Um die Verschiebungen der Spektren untereinander zu vernachlässigen und die Anstiege in den Seitenbanden besser erkennen zu können, werden die Spektren analog zu Kapitel 5.2.1 auf ein gemeinsames Maximum in x - und y -Richtung gebracht und Differenzspektren gebildet (Abbildung 5.34).

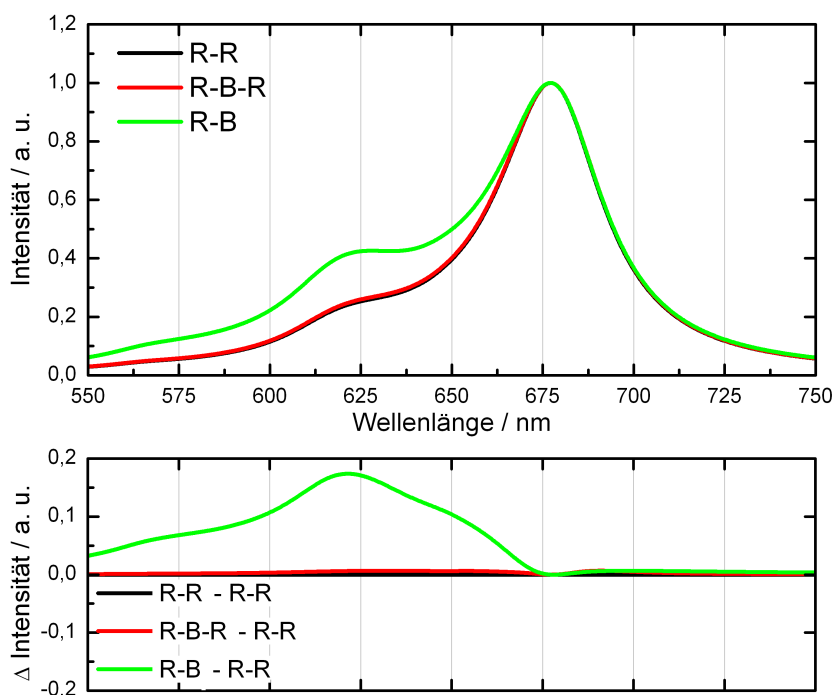


Abbildung 5.34: Normierte vibronische Spektren von R, R-R, R-B und R-B-R. Alle oberen Spektren wurden auf ein gemeinsames Maximum sowohl in x - als auch y -Richtung gebracht. Die Differenzspektren dieser Daten werden im unteren Graph abgebildet.

In den hier erhaltenen Differenzspektren tritt nur in der Anwesenheit eines einzelnen roten Farbstoffes ein Seitenbandeneffekt auf. Er ist hier nicht abhängig von Pyren.

Ein zweites Beispiel macht deutlich, wie sich die Absorbanz verändern würde, wenn sich Pyren auf einen der roten Farbstoffe zubewegen würde, während deren Position zueinander unverändert zu der Anordnung zuvor bliebe (Abbildung 5.35).

Es ist deutlich sichtbar, dass es im kleinsten Abstand von $2,3 \text{ \AA}$ zu einem Seitenbandeneffekt kommt, der allerdings nur auf der hypsochromen Seite deutlich erscheint. Dort ist bereits ab $3,8 \text{ \AA}$ eine Veränderung erkennbar. Dieser Abstand verursacht am Hauptmaximum jedoch noch keinen Abfall.

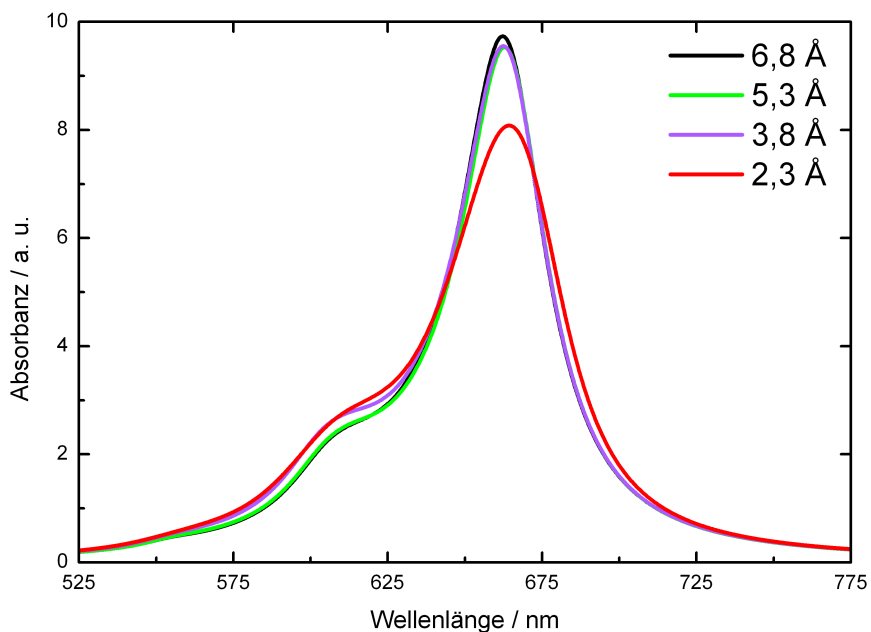


Abbildung 5.35: Vibronisches Spektrum von R_1BR_2 mit verschiedenen $R_1 \leftrightarrow B$ -Abständen.

In Abbildung 5.36 sind die Ergebnisse einer Anordnung zu sehen, in der alle Positionen der Farbstoffe konstant bleiben, während sich Pyren, das sich in der Mitte der beiden roten Farbstoffe befindet, von einer parallelen zu einer senkrechten Anordnung zu den beiden R-Farbstoffen dreht.

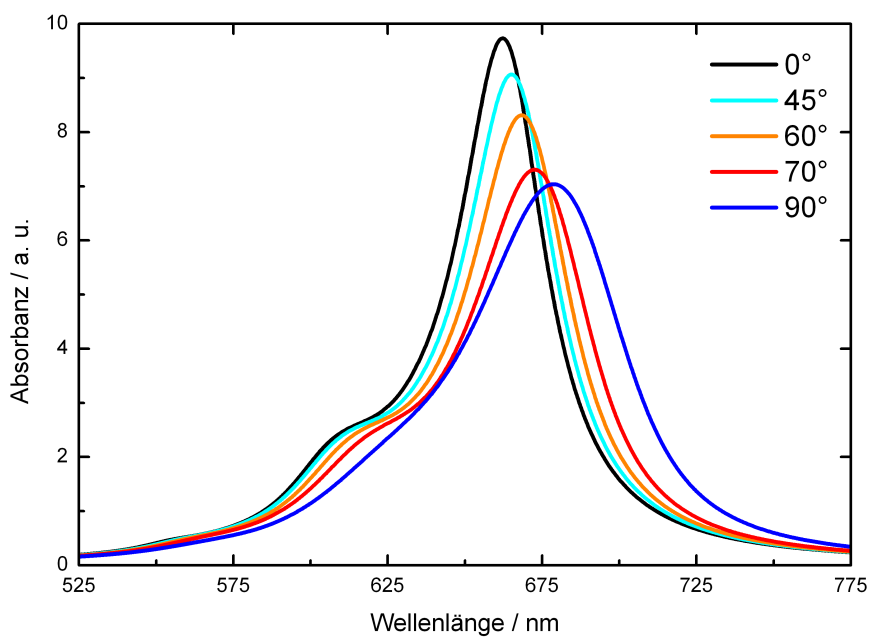


Abbildung 5.36: Vibronisches Spektrum von R_1BR_2 mit unterschiedlichen Rotationsgraden des Pyren-Moleküls.

Je größer der Winkel des Pyrens wird, desto bathochromer verschiebt sich das jeweilige Spektrum. Nur in der 90°-Anordnung verschwindet die Schulter auf der blauen Seite. Zur Verdeutlichung aller Unterschiede werden für die Abbildung 5.37 alle Spektren auf ein gemeinsames Maximum auf der x -Skala geschoben.

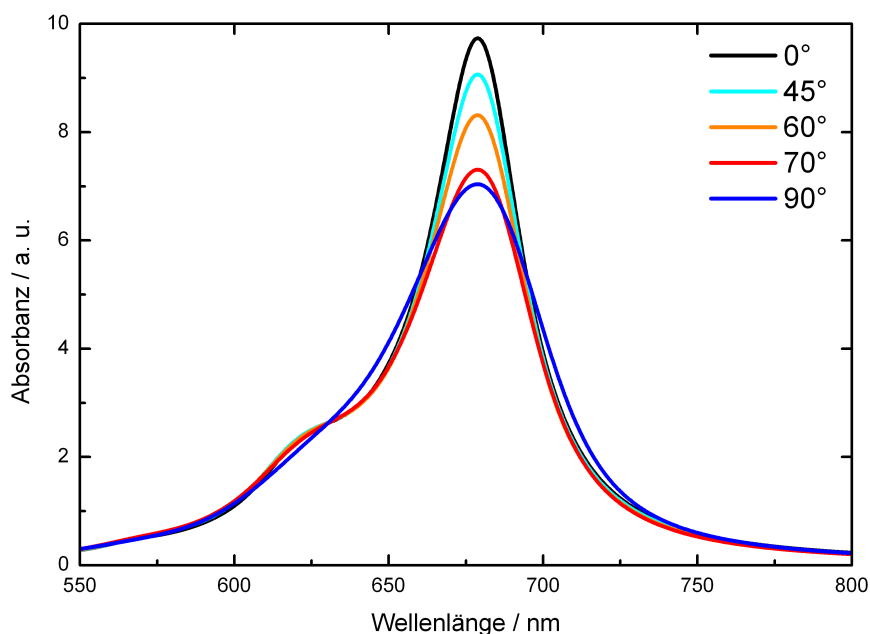


Abbildung 5.37: Normiertes vibronisches Spektrum von R-B-R mit unterschiedlichen Rotationsgraden des Pyren-Moleküls in Bezug auf die roten Farbstoffe.

Hier sind deutliche Unterschiede in der jeweiligen Ausprägung des Hauptmaximums erkennbar. Zunahmen an den Seiten des Spektrums sind jedoch erst in extremsten Fall zu sehen, der senkrechten Stellung zu R_1 und R_2 . In dieser Anordnung beträgt der Abstand der Farbstoffe zueinander allerdings weniger als $2,5 \text{ \AA}$ und ist somit sehr weit von realistischen Bedingungen entfernt.

Auch wenn die errechneten Spektren die experimentell gemessenen nicht exakt wiedergeben können, ist deutlich geworden, dass Pyren einen Effekt auf das Absorbanzverhalten der roten Farbstoffe hat.

5.2.3 Absorbanzspektren im Bereich des blauen Farbstoffs

Sollten es zu Wechselwirkungen zwischen B und den R-Farbstoffen kommen, müssten diese auch im Absorbanzspektrum von Pyren zu Veränderungen führen, sobald alle drei Farbstoffe zusammen vorliegen. Als einleitendes Beispiel wird wiederum die homochromophore Kombi-

nation I-a verwendet, in der die Farbstoffe im Sinne der *Up-* und *Downconversion* energetisch ähnlich sind und 4 bp auseinanderliegen.

Abbildung 5.38 geht zunächst auf die Spektren von NBN und R_1BR_2 ein. Zum Vergleich wird das Summenspektrum aus NBN und R_1NR_2 mit hinzugezogen. Dieses sollte R_1BR_2 entsprechen, wenn es keinen Einfluss des möglichen Dimers R_1NR_2 auf NBN gibt.

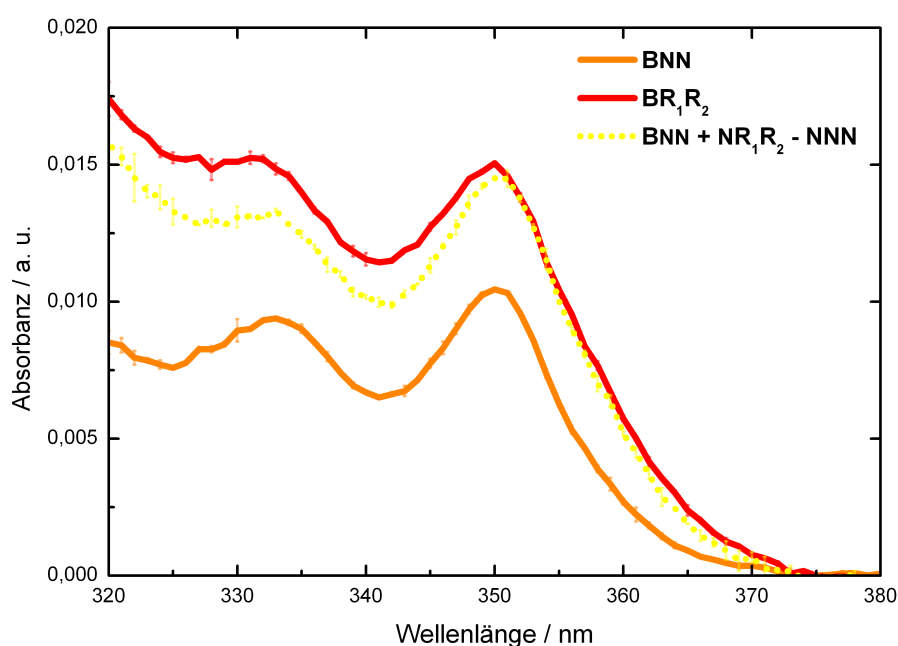


Abbildung 5.38: Vergleich der Absorbanzwerte von NBN, R_1BR_2 und dem Summenspektrum ($NBN + R_1NR_2 - NNN$).

Das Spektrum von R_1BR_2 liegt insgesamt leicht erhöht vor, ebenso schwach ist eine hypsochrome Verschiebung vom Summenspektrum zur Dreierprobe erkennbar. Ein Absinken der Intensität wie in den Spektren im roten Bereich ist jedoch nicht erkennbar.

Für die nachfolgende Abbildung 5.39 wurde ein weiteres Summenspektrum hinzugenommen, das den Einfluss jedes einzelnen roten Farbstoffes auf B widerspiegeln kann. Dafür wurden beide BR-Spektren addiert und die einzelne, unbeeinflusste NBN-Probe abgezogen.

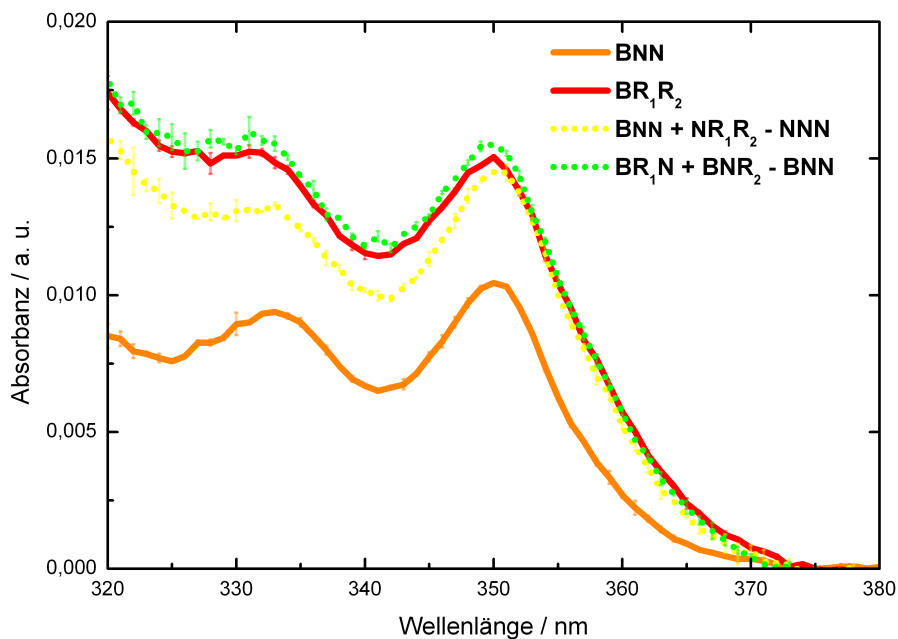


Abbildung 5.39: Vergleich von NBN und R_1BR_2 der Kombination I-a mit zwei verschiedenen Summenspektren zur Erzeugung von R_1BR_2 .

Das neu entstandene Summenspektrum (in grün dargestellt) verläuft bei höheren Wellenlängen ähnlich zu dem vorherigen Summenspektrum, zeigt jedoch im Maximum eine höhere Intensität und geht anschließend annähernd in das Spektrum der Dreierprobe über. In Relation zu $(R_1BN + NBR_2)$ ist es jedoch ebenfalls leicht hypsochrom verschoben.

Diese Veränderung des Absorbanzmaximums durch das Vorhandensein mindestens eines roten Farbstoffes wird auch der folgenden Abbildung 5.40 bestätigt. Hier wurden die Einzelabsorbanzen von NBN, R_1BN und NBR_2 mit den Summenspektren von NBN und dem jeweiligen R-Farbstoff verglichen.

Beide Summenspektren liegen bathochrom verschoben vor, sodass auch hier bei Anwesenheit eines roten Farbstoffes das Maximum zwar noch immer bei 350 nm liegt, sich aber bei genauerer Betrachtung ein extrapoliertes Maximum zu niedrigeren Wellenlängen ergäbe.

Zur gleichen Betrachtung des Verhaltens der roten Chromophore in diesem Wellenlängenbereich werden die Spektren von R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 verglichen und um ein Summenspektrum aus $(R_1NN + NNR_2)$ ergänzt (Abbildung 5.41).

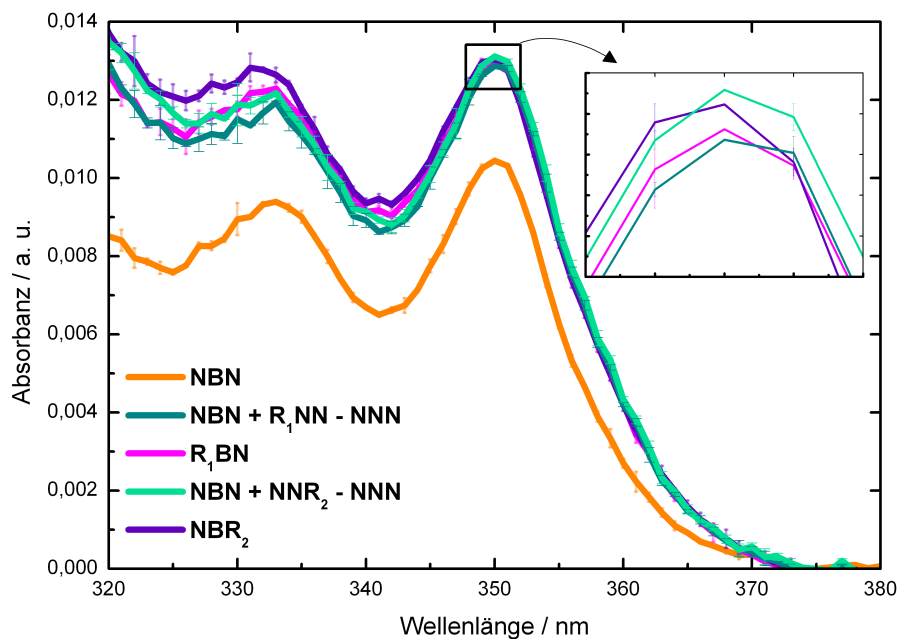


Abbildung 5.40: Vergleich von NBN mit den praktischen und theoretischen BR-Spektren (R_1BN , NBR_2 , $(NBN + R_1NN - NNN)$ und $(NBN + NNR_2 - NNN)$)

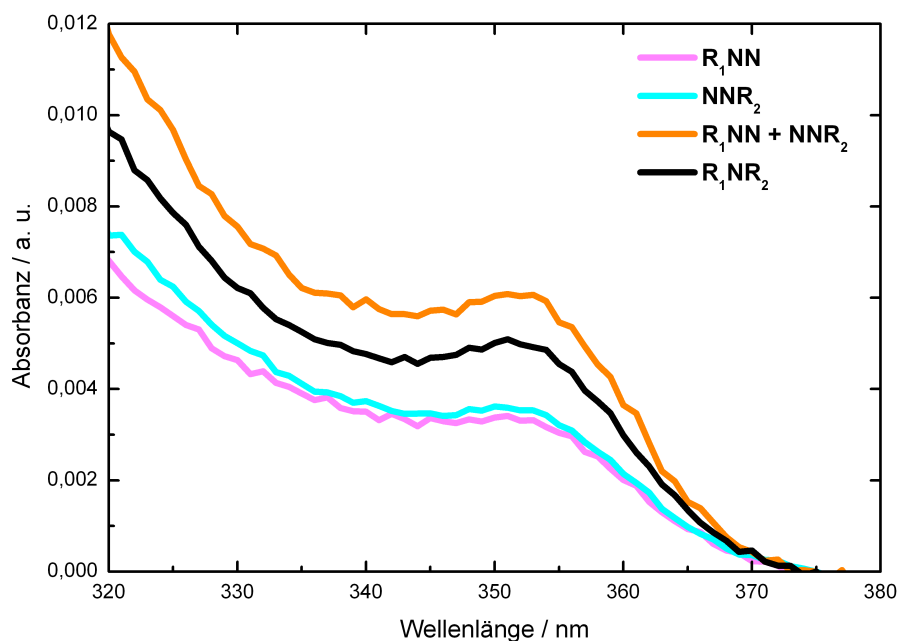


Abbildung 5.41: Verhalten der roten Farbstoffe im blauen Wellenlängenbereich. Es werden die Spektren der einzelnen R-Farbstoffe mit der R_1NR_2 -Probe und dem hypothetischen Spektrum aus $(R_1NN + NNR_2)$ verglichen.

Da R_1 und R_2 in dieser Kombination gleich sind, ist auch ihr Absorbanzverhalten sehr ähnlich. Das berechnete Spektrum beider Komponenten liegt allerdings deutlich höher als das der tatsächlichen Zweierkombination R_1NR_2 (etwa 20 %).

Zudem sollen auch in diesem Wellenlängenbereich die wichtigsten Wechselwirkungen in allen Kombinationen miteinander verglichen werden. Hierzu werden alle Möglichkeiten zur Berechnung der Dreierkombination gegenübergestellt:

- eine Addition aller Einzelspektren zur Erstellung eines hypothetischen Spektrums ohne jegliche Wechselwirkungen der Farbstoffe untereinander ($\text{NBN} + \text{R}_1\text{NN} + \text{NNR}_2$ abzüglich zweier überzähliger NNN-Proben),
- eine Addition des blauen Einzelspektrums mit dem von R_1NR_2 zur Überprüfung des Einflusses des möglichen roten Dimeres ($\text{NBN} + \text{R}_1\text{NR}_2$ jeweils abzüglich einer überzähligen NNN-Probe),
- eine Addition der beiden BR-Spektren zur Betrachtung der Einflüsse eines roten Farbstoffes auf Pyren ($\text{R}_1\text{BN} + \text{NBR}_2$ abzüglich einer überzähligen NBN-Probe).

Diese drei Berechnungsmethoden werden in Abbildung 5.42 der tatsächlichen Dreierprobe gegenübergestellt und zur Erzeugung von Differenzspektren das ($\text{NBN} + \text{R}_1\text{NN} + \text{NNR}_2$)-Spektrum von allen subtrahiert.

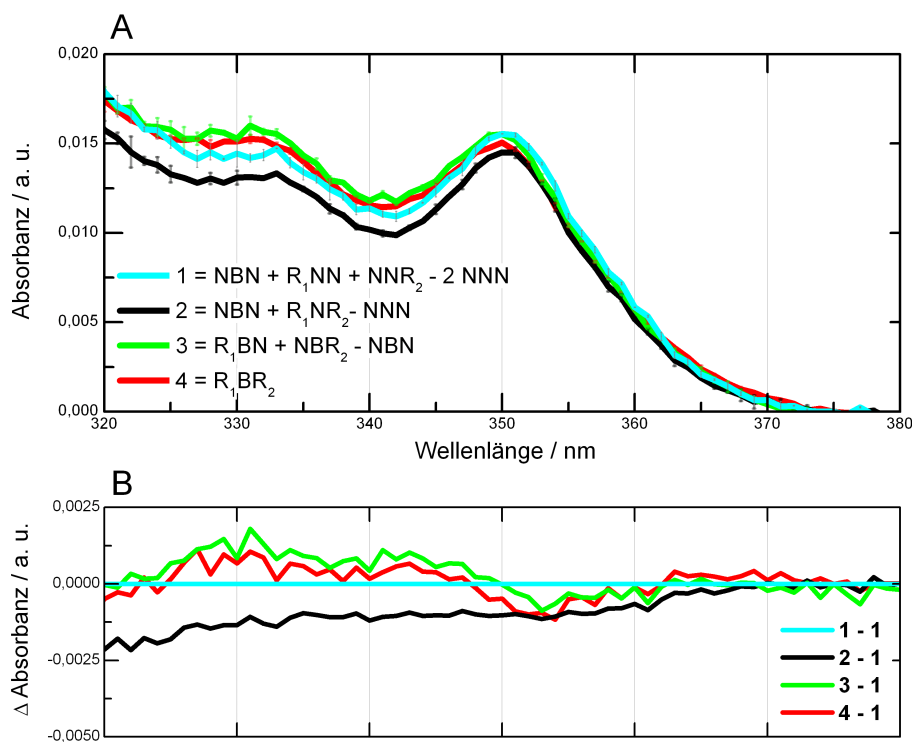


Abbildung 5.42: Spektren von ($\text{NBN} + \text{R}_1\text{NR}_2 - \text{NNN}$), R_1BR_2 , ($\text{BR}_1 + \text{BR}_2 - \text{NBN}$) und ($\text{NBN} + \text{R}_1\text{NN} + \text{NNR}_2$) (in **A**) und daraus berechnete Differenzspektren (in **B**) der Kombination I-a. Aus Übersichtsgründen bezieht sich die Legende der Differenzspektren in **B** auf die Nummerierung der Spektren in **A**.

Dabei verlaufen die Maxima derjenigen Proben sehr ähnlich, in denen R_1 und R_2 nicht gleichzeitig vorliegen. Deutlich am niedrigsten liegt das Summenspektrum aus NBN und R_1NR_2 (etwa 6 % niedriger als $(NBN + R_1NN + NNR_2)$). Im unteren Teil der Abbildung ist auffällig, dass die Differenzspektren von $(R_1BN + NBR_2 - NBN)$ und R_1BR_2 sehr ähnlich verlaufen.

Für mögliche quantitative Vergleiche wurden die Spektren für die folgende Abbildung 5.43 wiederum normiert. Das Verschieben aller vier beteiligter Spektren auf ein gemeinsames Maximum muss hier nicht durchgeführt werden, da dieses konstant bei 350 nm bleibt (bei Betrachtung der reinen Werte, die leichte Verschiebung der Spektren zueinander wurde bereits in Abbildung 5.40 gezeigt).

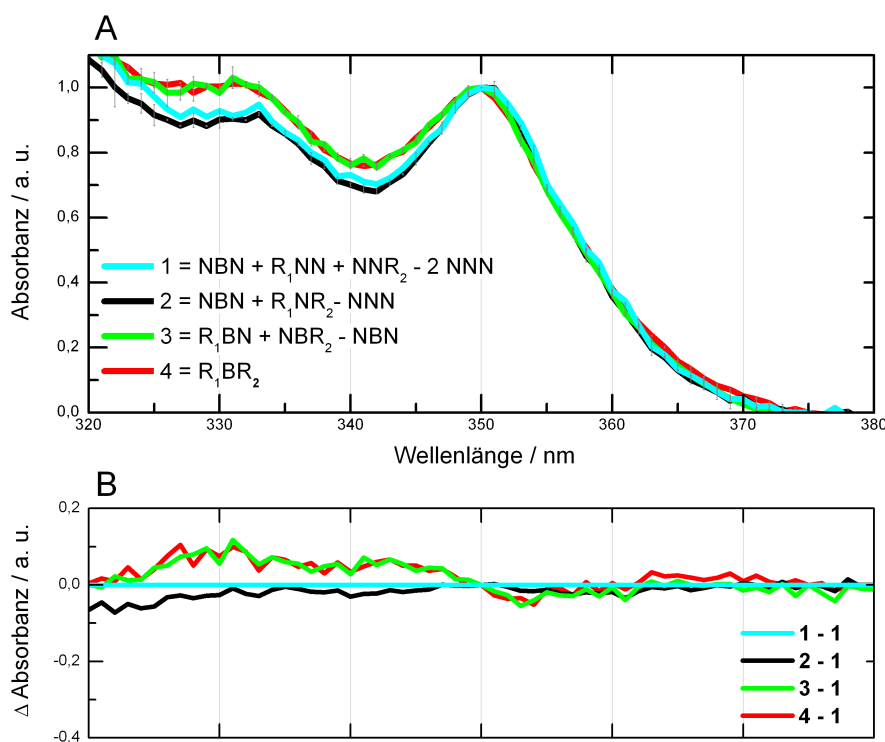


Abbildung 5.43: Normalisierte Spektren von $(NBN + R_1NR_2 - NNN)$, R_1BR_2 , $(R_1 + BR_2 - NBN)$ und $(NBN + R_1NN + NNR_2)$ aus Abbildung 5.42 und daraus berechnete Differenzspektren der Kombination I-a.

Der Verlauf der Differenzspektren von $(R_1BN + NBR_2)$ und R_1BR_2 ist wieder sehr ähnlich, das von $(NBN + R_1NR_2)$ liegt wieder unterhalb der Referenzlinie.

Um zu überprüfen, wie sich die Spektren verändern, wenn der Abstand zwischen den bisher betrachteten R-Chromophoren auf 10 bp erweitert wird, wird im Folgenden auf Kombination II-a eingegangen.

Zu Beginn werden die Spektren von NBN und R_1BR_2 mit dem Summenspektrum aus NBN und R_1NR_2 verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.44 zu sehen.

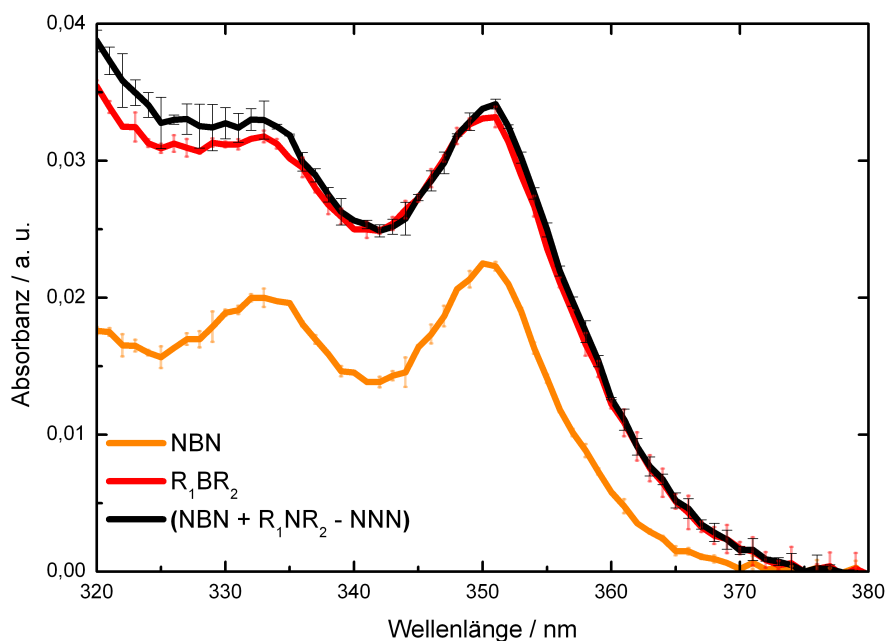


Abbildung 5.44: Absorbanzspektren von NBN, R_1BR_2 und dem Summenspektrum ($NBN + R_1NR_2$ mit Abzug einer überzähligen NNN-Probe) der Kombination II-a.

In dieser Kombination liegt das hypothetische Spektrum aus NBN und R_1NR_2 etwas erhöht, aber wieder leicht bathochrom verschoben vor. Wie sich Pyren in dieser Kombination verhält, wenn lediglich einer der roten Farbstoffe hinzukommt, zeigt Abbildung 5.45. Hier wird das hypothetische Summenspektrum aus R_1BN und NBR_2 hinzugenommen.

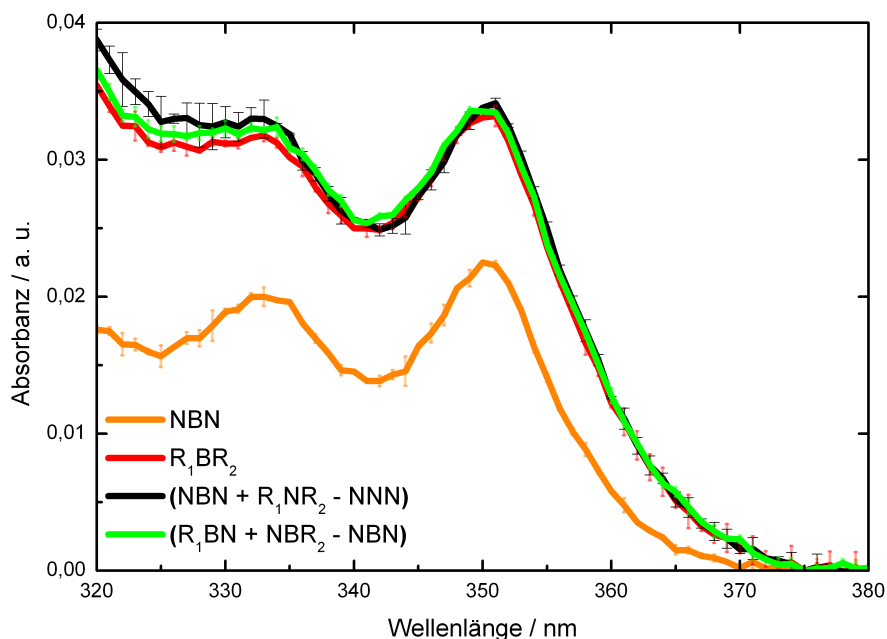


Abbildung 5.45: Vergleich von NBN und R_1BR_2 der Kombination II-a mit zwei möglichen Summenspektren für R_1BR_2 : ($NBN + R_1NR_2$) und ($R_1BN + NBR_2$).

Das neu hinzugekommene Summenspektrum befindet sich grob zwischen beiden Dreierspektren und weist keine deutliche Maximumverschiebung auf.

Zur genaueren Betrachtung des Verhaltens von B gegenüber den roten Farbstoffen werden die Spektren von NBN, R_1BN und NBR_2 miteinander verglichen. Zusätzlich werden Summenspektren aus $(NBN + R_1NN)$ und $(NBN + NNR_2)$ berechnet (s. Abbildung 5.46).

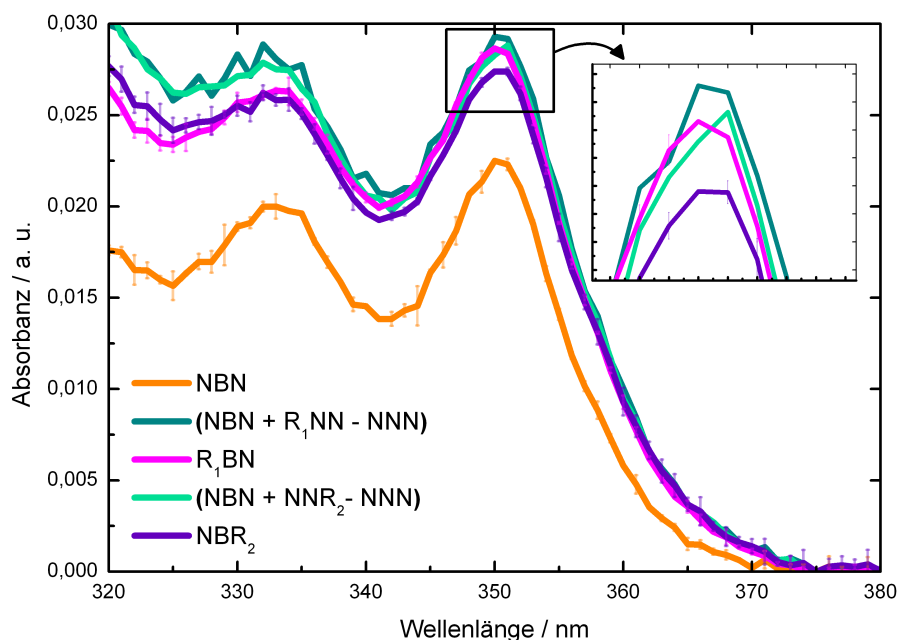


Abbildung 5.46: Vergleich von NBN, R_1BN , NBR_2 und den dazugehörigen Summenspektren $(NBN + R_1NN)$ und $(NBN + NNR_2)$.

Die Summenspektren liegen im Schnitt 4 % über den tatsächlichen Spektren, d. h. eine leichte Schwächung der Absorbanz von Pyren durch die roten Farbstoffe ist erkennbar. Eine hypso- oder bathochrome Verschiebung des Maximums findet nicht statt.

Zusätzlich wird auf das Absorbanzverhalten von R_1 und R_2 in diesem Bereich eingegangen. Dazu werden die Spektren von R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 mit dem berechneten Summenspektrum $(R_1NN + NNR_2)$ verglichen (Abbildung 5.47).

R_1 und R_2 sind auch in dieser Kombination identisch, sodass das sehr ähnliche Absorbanzverhalten der Einzelfarbstoffproben nachvollziehbar ist. Ähnlich wie in der Kombination zuvor, liegt das R_1NR_2 -Spektrum mit einer um etwa 13 % verminderten Absorbanz gegenüber dem theoretischen vor.

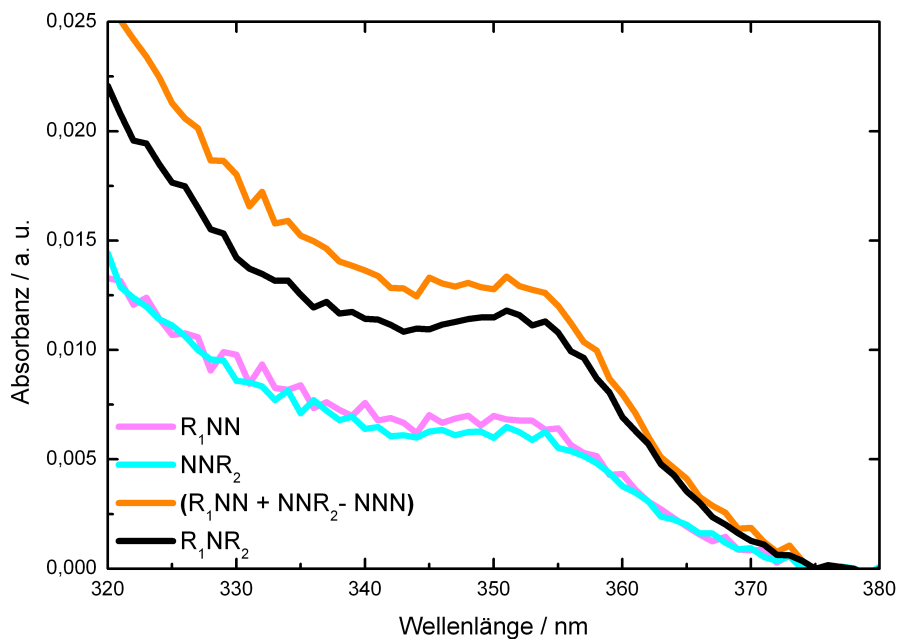


Abbildung 5.47: Verhalten der roten Farbstoffe von Kombination II-a im blauen Wellenlängenbereich.

Um alle wichtigen Einflüsse auf B zusammenzufassen, werden in Abbildung 5.48 alle Berechnungsmethoden zur Bildung hypothetischer Dreierspektren mit dem tatsächlichen Spektrum verglichen.

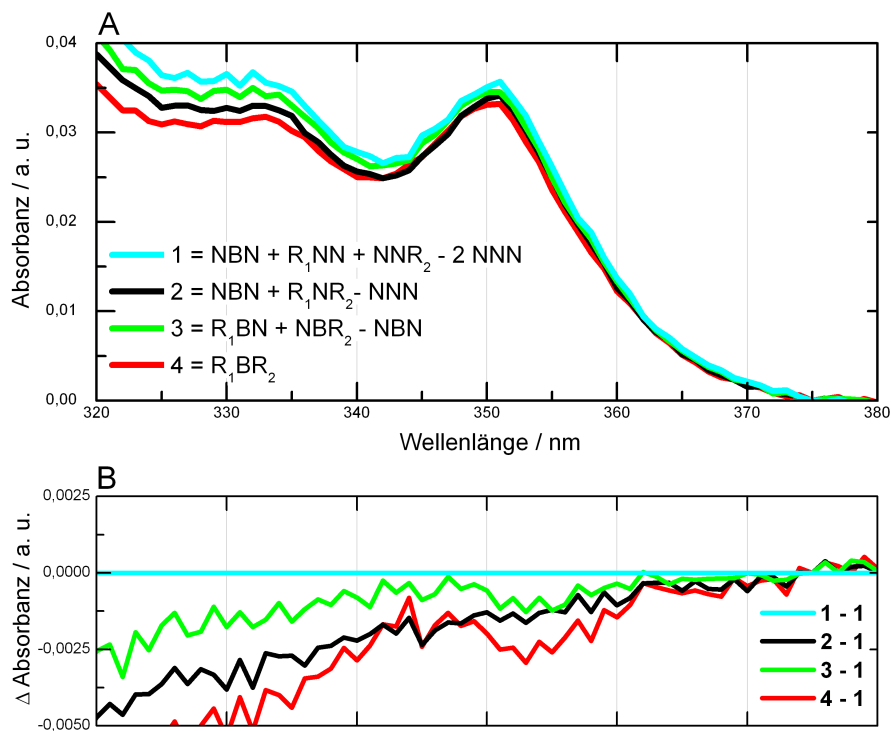


Abbildung 5.48: A: Darstellung von R_1BR_2 der Kombination II-a im Vergleich mit allen möglichen Summenspektren ($NBN + R_1NN + NNR_2$), ($NBN + R_1NR_2$) und ($R_1BN + NBR_2$). B: sich aus A ergebende Differenzspektren.

Im Hauptmaximum sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar, erst im kürzerwelligeren Bereich zeichnet sich eine Reihenfolge ab, die im Differenzspektrum besonders deutlich hervortritt: Mit (anzunehmend) zunehmender Wechselwirkung sinkt die Absorbanz von keiner Wechselwirkung über B mit R_1NR_2 und B mit jeweils einem R-Farbstoff zu letztlich R_1BR_2 . Dass sich die Spektren auch tatsächlich lediglich in ihrer Höhe der Absorbanz unterscheiden, macht Abbildung 5.49 deutlicher. Hier wurden die eben gezeigten Spektren wiederum auf ihr Maximum bei 350 nm normiert.

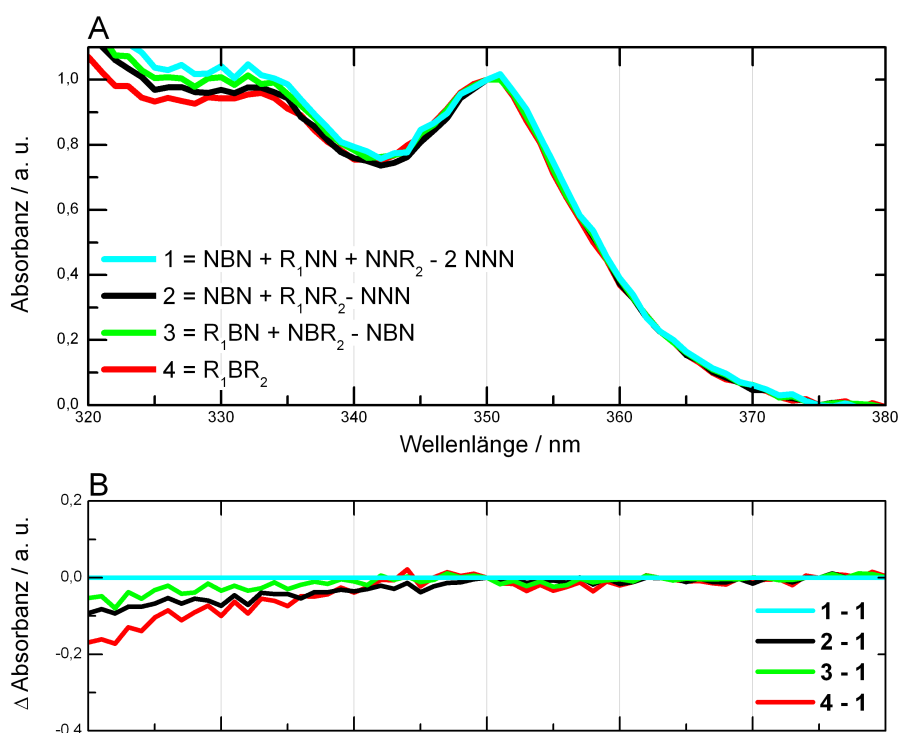


Abbildung 5.49: A: Auf das Hauptmaximum normierte Darstellung von R_1BR_2 der Kombination II-a im Vergleich mit allen möglichen Summenspektren ($NBN + R_1NN + NNR_2$), ($NBN + R_1NR_2$) und ($R_1BN + NBR_2$). B: sich aus A ergebende Differenzspektren.

Erst stark im kürzerwelligeren Bereich ist ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Spektren zu sehen. Dieser Bereich eignet sich jedoch nicht für eine quantitative Betrachtung solch schwacher Gesamtabsoorbilanzen wie hier bei Pyren. Erst bei einer sehr starken Gesamtabsoorbilanz wie im Falle der DNA lässt sich ein Unterschied zu allgemeinen Absorptionsprozessen in diesem Wellenlängenbereich erkennen.

Trotz dieser nicht optimalen Umstände wird im folgenden kurz auf die repräsentative Kombination III-a der Gruppe III eingegangen. Zunächst wird in Abbildung 5.50 das Verhalten von Pyren gegenüber der jeweiligen Dimere untersucht.

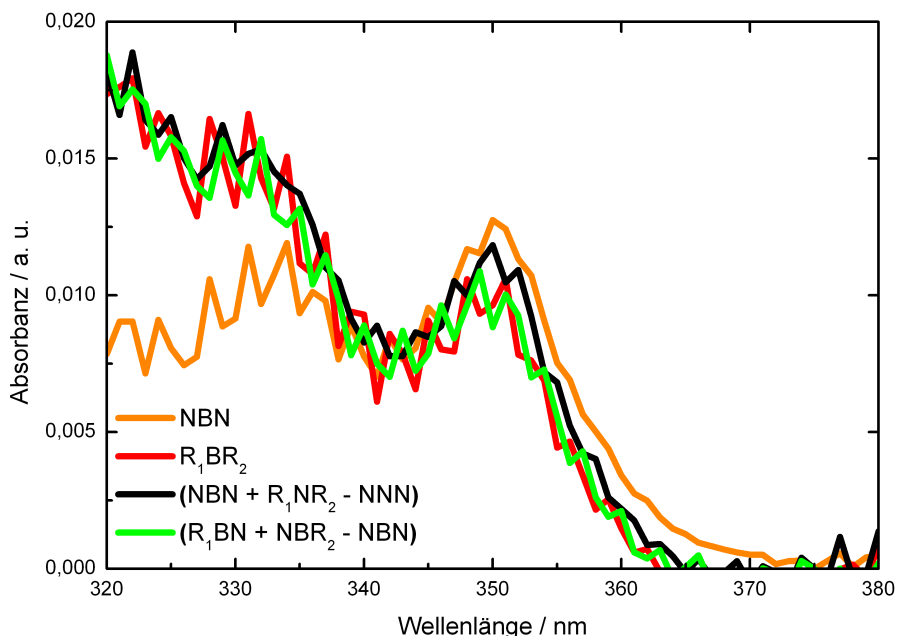


Abbildung 5.50: Absorbanzverhalten von Pyren gegenüber der jeweiligen Dimere in Kombination III-a.

Das NBN-Spektrum liegt am Maximum bei 350 nm nur in einem geringen Maße intensiver vor als die Spektren der anderen Proben. Erst unter 335 nm ergeben sich deutlich andere Verläufe: Die R-enhaltenen Proben absorbieren dort sehr viel stärker als die Probe, die außer der DNA nur Pyren enthält. Insgesamt betrachtet sind die Unterschiede, vor allem am Maximum, mit $\pm 10\%$ um den Mittelwert als gering einzuschätzen. Dies bestätigt auch die Abbildung 5.51, in der das Verhalten von Pyren gegenüber den einzelnen roten Farbstoffen R_1 und R_2 aufgezeigt wird. Es sind keine signifikanten Verschiebungen des Maximums bei 350 nm feststellbar, die Schwankung um den Mittelwert beträgt nach wie vor etwa 10 %.

Die bisher auftretenden Effekte zeigten sich bisher klarer in Veränderungen der Maximapositionen als in Veränderungen der Spektrenverläufe selber. Eine einzelne Darstellung der vier wichtigsten Spektren kann dabei mitunter wenig Informationen beinhalten. In einem gesamten Vergleich über alle Gruppen hinweg lassen sich jedoch Gemeinsamkeiten erkennen (Abbildungen 5.52 bis 5.53). Für diese Darstellung wurden die auf das Hauptmaximum normierten Spektren verwendet. Begonnen wird mit der Präsentation der Kombinationen, in denen R_1 und R_2 4 bp voneinander entfernt vorliegen (Kombination I-a).

Die Differenzspektren lassen sich jeweils in zwei Gruppen einteilen: Das Summenspektrum aus NBN und R_1NR_2 verläuft stets sehr ähnlich zur Basislinie, die dem Summenspektrum aller einzelnen Probenabsorbanzen entspricht. Dagegen liegen die Proben, die B und mindestens

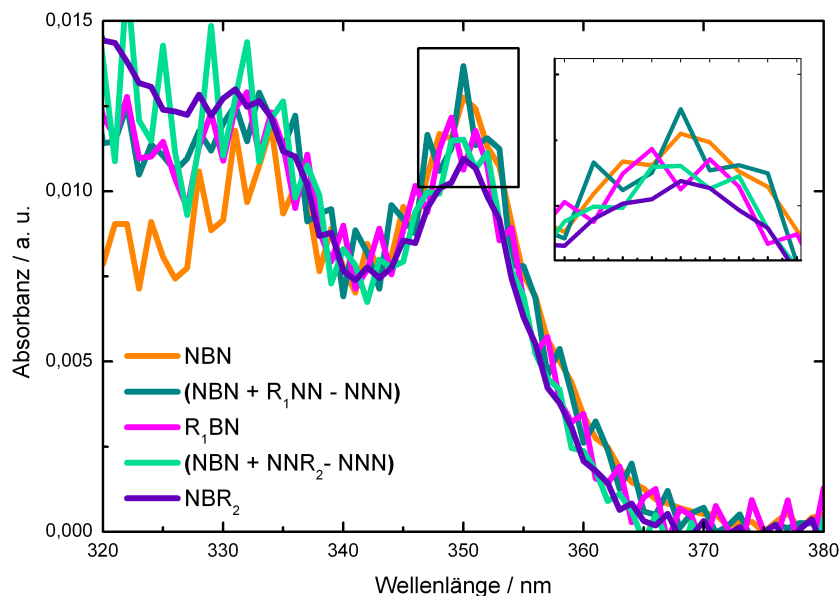


Abbildung 5.51: Absorbanzverhalten von Pyren gegenüber R_1 und R_2 in Kombination III-a.

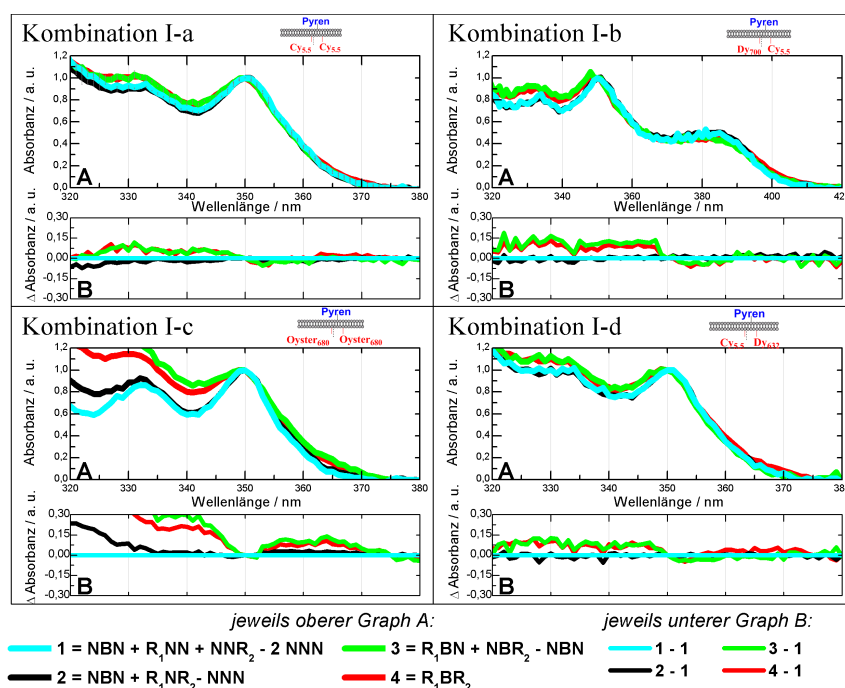


Abbildung 5.52: Darstellung der normierten Absorbanz aller Kombinationen der Gruppe I im blauen Wellenlängenbereich. **A**: die vier wichtigsten Spektren, die jeweils auf das Hauptmaximum bei 350 nm normiert wurden. **B**: sich aus **A** ergebende Differenzspektren. Zur besseren Lesbarkeit wurde eine verkürzte Legende verwendet (1 = (NBN + R_1 NN + NNR_2 - 2 NNN); 2 = (NBN + R_1 NR₂-NNN); 3 = (R_1 BN + NBR₂-NBN); 4 = R_1 BR₂).

einen R-Farbstoff aufweisen, immer höher und weisen sehr ähnliche Absorbanzen auf. Diese Trends lassen sich in den Proben der Gruppe II und III nicht durchweg bestätigen (siehe Abbildung 5.53).

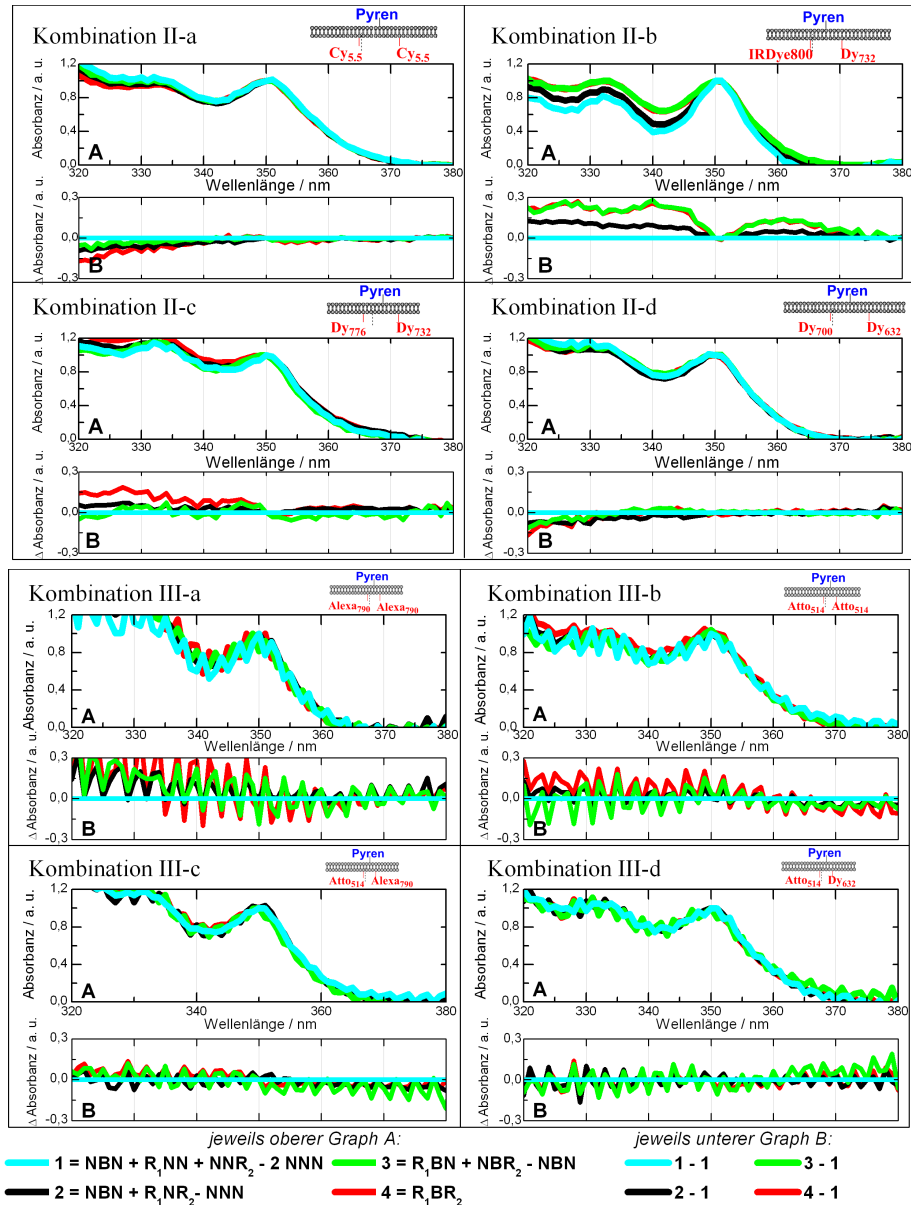


Abbildung 5.53: Darstellung der normierten Absorbanz aller Kombinationen der Gruppe II im blauen Wellenlängenbereich. **A:** die vier wichtigsten Spektren, die jeweils auf das Hauptmaximum bei 350 nm normiert wurden. **B:** sich aus **A** ergebende Differenzspektren. Zur besseren Lesbarkeit wurde eine verkürzte Legende verwendet (1 = (NBN + R₁NN + NNR₂ - 2 NNN); 2 = (NBN + R₁NR₂ - NNN); 3 = (R₁BN + NBR₂ - NBN); 4 = R₁BR₂).

Es lassen sich keine signifikanten Gruppierungen erkennen. Lediglich in Kombination II-b ist ein ähnlicher Trend erkennbar wie zuvor in Gruppe I: Die Spektren der Proben, in denen Pyren mit mindestens einem der roten Farbstoffe gleichzeitig vorliegt, sind gegenüber der Pyren-Einzelproben verbreitert und erzeugen dadurch einen positiven Anstieg in den Differenzspektren..

In einer letzten Betrachtung soll auch in diesem Wellenlängenbereich auf hypothetische Spektren der einzelnen Wechselwirkungen eingegangen werden. Hierzu werden nach den Gleichungen 5.1 bis 5.5 nach der „Delta-Methode“ Spektren berechnet und in den Abbildungen 5.54 und 5.55 dargestellt. Zunächst wird dabei auf die Ergebnisse der Kombinationen der Gruppe I eingegangen, in der R_1 und R_2 4 bp auseinander liegen und energetisch ähnlich sind.

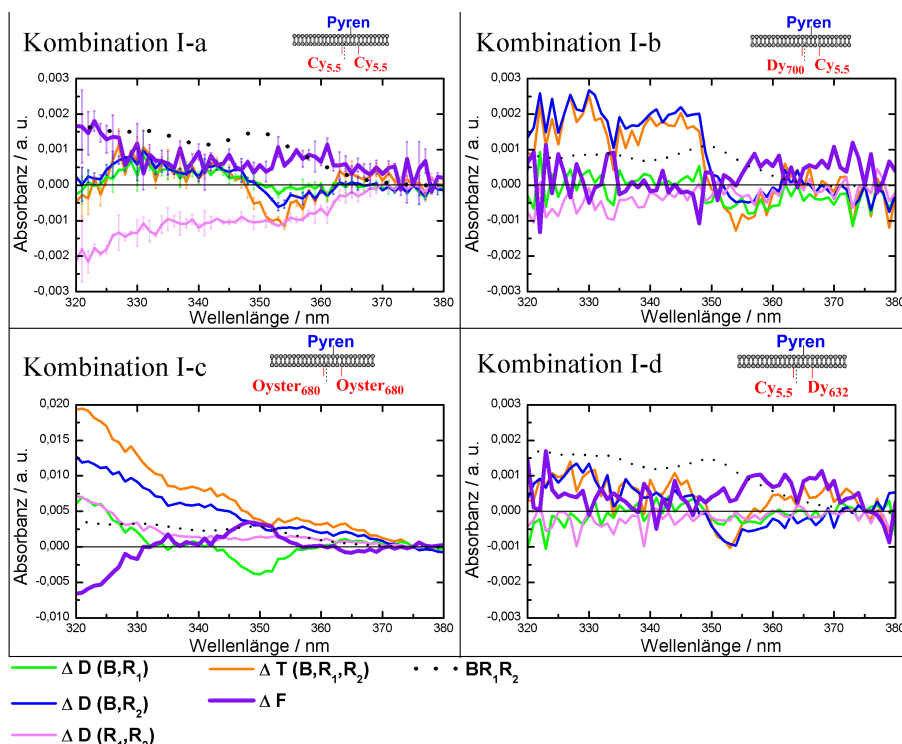


Abbildung 5.54: Darstellung der mit der „Delta-Methode“ berechneten Spektren der Kombinationen der Gruppe I. Zum Vergleich der Absorbanzwellenlängen wurde das Spektrum von R_1BR_2 mit in diesen Verlauf geplottet und auf den vorliegenden y-Bereich skaliert.

Ein bestimmter Verlauf, der in allen vier Kombinationen auftritt, ist nicht erkennbar. Das wichtige finale Spektrum (violett) nimmt lediglich in Kombination I-c im Bereich des Maximums keine positiven Werte an. Die Verläufe, die zu diesen Werten führen, lassen jedoch keinen Rückschluss auf dieses Spektrum zu. Sehr ähnlich sehen die Ergebnisse der beiden anderen Gruppen II und III aus (Abbildung 5.55).

5.2.4 Emissionsspektren im roten Bereich

Der Fokus der folgenden Spektren liegt auf der Darstellung der Fluoreszenz-Emissionsspektren der Proben bei Anregung mit der jeweiligen Absorbanzmaximums-Wellenlänge, aufgeteilt nach

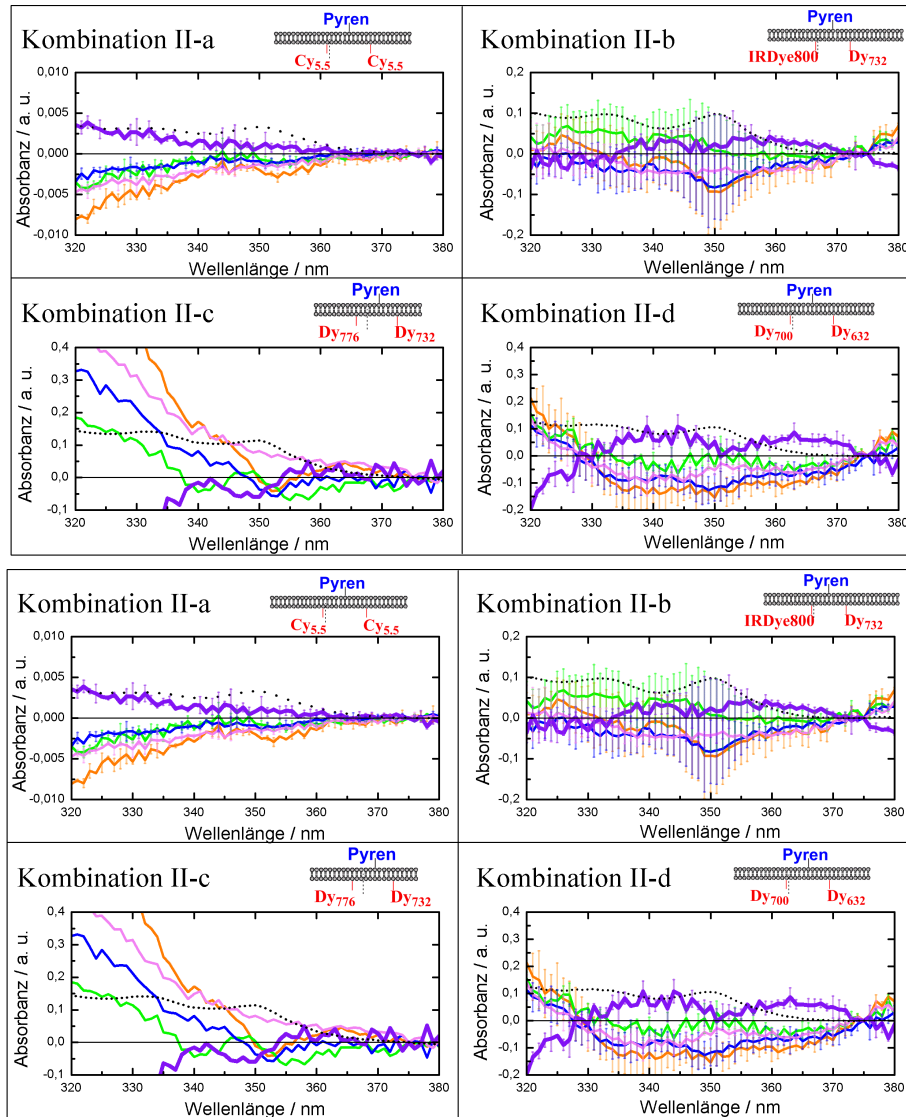


Abbildung 5.55: Darstellung der mit der „Delta-Methode“ berechneten Spektren der Gruppen II und III. Zum Vergleich der Absorbanzwellenlängen wurde das Spektrum von R_1BR_2 jeweils mit in diesen Verlauf geplottet und auf den vorliegenden y-Bereich skaliert.

den Farbstoffen R_1 und R_2 . Dies bedeutet, dass alle Spektren, die sich in einem Graphen befinden, bei derselben Wellenlänge angeregt wurden. Dabei ist das Auftreten verschiedener Effekte möglich:

- Falls es zu keinerlei Wechselwirkung zwischen R_1 , R_2 und B kommen sollte, bliebe das jeweilige Emissionsspektrum von R_1BR_2 probenunabhängig gleich.
- Im Falle von FRET würde die Intensität des R_1NN in R_1NR_2 (und R_1BR_2) absinken. Im R_2 -Bereich der Spektren würde kein Unterschied feststellbar sein, da der für FRET typi-

sche Anstieg der Akzeptorfluoreszenz nur bei der Anregung mit $\lambda_{\text{Abs,max}}^{\text{D}}$ auftritt, jedoch nicht bei $\lambda_{\text{Abs,max}}^{\text{A}}$.

- Wenn Pyren bereits auf die einzelnen Chromophore einen Einfluss ausübt, so sollten in diesem Falle die Spektren von R_1BN und NBR_2 im Vergleich zu R_1NN und NNR_2 absinken.
- Tritt erst in der Dreierkombination eine Wechselwirkung auf, so sollte das R_1BR_2 -Spektrum in beiden Graphen (stark) absinken oder mindestens unter dem jeweiligen BR-Spektrum liegen.

Da im Abschnitt 5.1.1 gezeigt werden konnte, dass Pyren in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbiert, zeigt es hier auch keine Emission. NBN-Spektren werden deshalb vernachlässigt.

Aus Vergleichbarkeitsgründen wird in den nachfolgenden Abbildungen auf die Darstellung der Rohspektren verzichtet und sofort eine Normierung auf das jeweilige R-Maximum durchgeführt. Hierzu werden die bereits genannten Spektren R_1NN bzw. NNR_2 , R_1BN bzw. NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2 durch einen gemeinsamen Faktor geteilt, der sich aus der Normierung von R auf sein Maximum ergibt.

Begonnen wird auch hier mit der Darstellung der Spektren von Kombination I-a. Da in dieser Kombination zweimal der gleiche R-Farbstoff vorliegt, ist der Anteil an R in den Spektren von R_1NR_2 und R_1BR_2 doppelt so hoch. Zur Vergleichbarkeit muss daher untersucht werden, ob es legitim ist diese beiden Spektren zu halbieren oder ob das jeweilig andere R-Spektrum abgezogen werden muss. In Abbildung 5.56 sind daher die Spektren von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 sowie das Summenspektrum aus R_1NN und NNR_2 gezeigt.

Erkennbar ist, dass eine Addition der beiden roten Einzelspektren zu einem deutlich höheren Ergebnis führt als das tatsächlich gemessene R_1NR_2 -Spektrum. Da es somit wahrscheinlich zu Wechselwirkungen zwischen den beiden R-Chromophoren kommt, scheidet die Methode der Subtraktion des jeweilig anderen einzelnen R-Farbstoffes vom R_1NR_2 - und R_1BR_2 -Spektrum aus. Da außerdem davon auszugehen ist, dass beide R-Farbstoffe zu gleichen Teilen zu diesem Spektrum beitragen, werden die R_1NR_2 - und R_1BR_2 -Spektren im Folgenden halbiert.

Abbildung 5.57 zeigt die für R_1 vier wichtigsten Spektren R_1NN , R_1BN , R_1NR_2 und R_1BR_2 , die alle bei derselben Wellenlänge angeregt wurden und so skaliert wurden, dass R_1NN in Relation zu ihnen den Wert Eins annimmt.

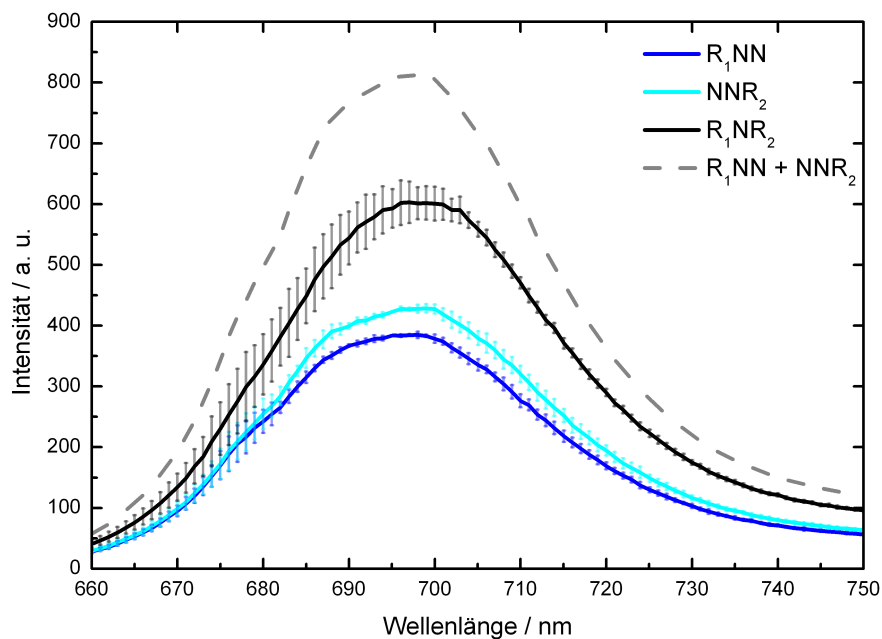


Abbildung 5.56: Emissionsspektren der Kombination I-a aus von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 sowie dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$). Bei dem gezeigten Spektrum von R_1NR_2 handelt es sich um einen Mittelwert des auf R_1NN -normierten R_1NR_2 -Spektrums und des auf NNR_2 -normierten R_1NR_2 -Spektrums.

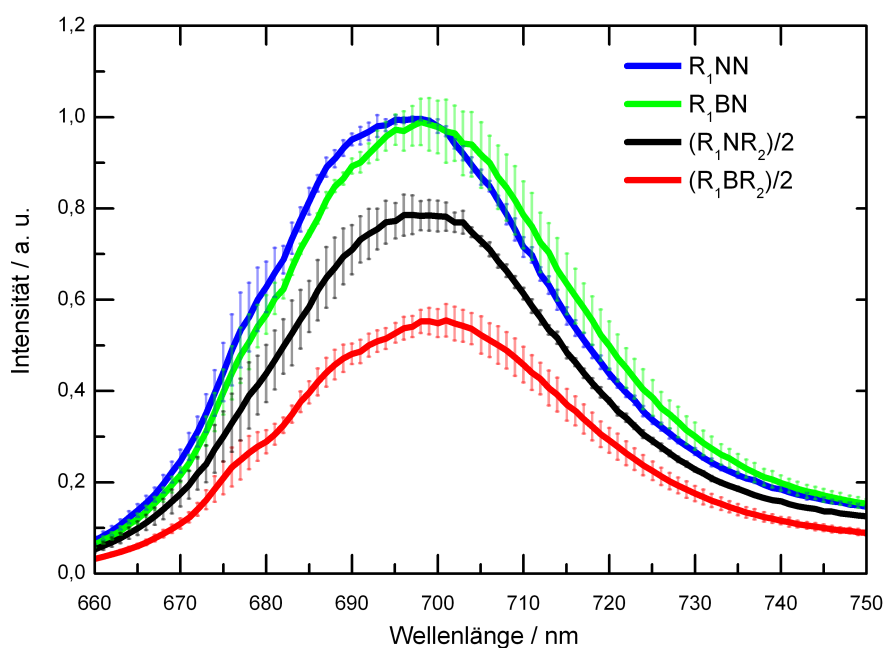


Abbildung 5.57: Normierte Emissionsspektren der Kombination I-a von R_1NN , BR_1 , R_1NR_2 und R_1BR_2 . R_1NN wurde auf sein Maximum normiert, die übrigen Spektren dazu in Relation gesetzt. R_1NR_2 und R_1BR_2 wurden aus oben genannten Gründen halbiert.

Die Spektren machen deutlich, dass bei Anwesenheit von Pyren alleine keine Intensitätsunterschiede entstehen. Es ist lediglich eine leichte bathochrome Verschiebung des Maximums erkennbar. Sind beide roten Farbstoffe gleichzeitig präsent, erfolgt eine Intensitätsabnahme des

R_1 NN-Spektrums um etwa 21 %. Bei Vorhandensein aller drei Farbstoffe beträgt die Abnahme sogar etwa 45 %. Sehr ähnlich sieht der Verlauf der Spektren aus, wenn sie auf R_2 bezogen sind (Abbildung 5.58).

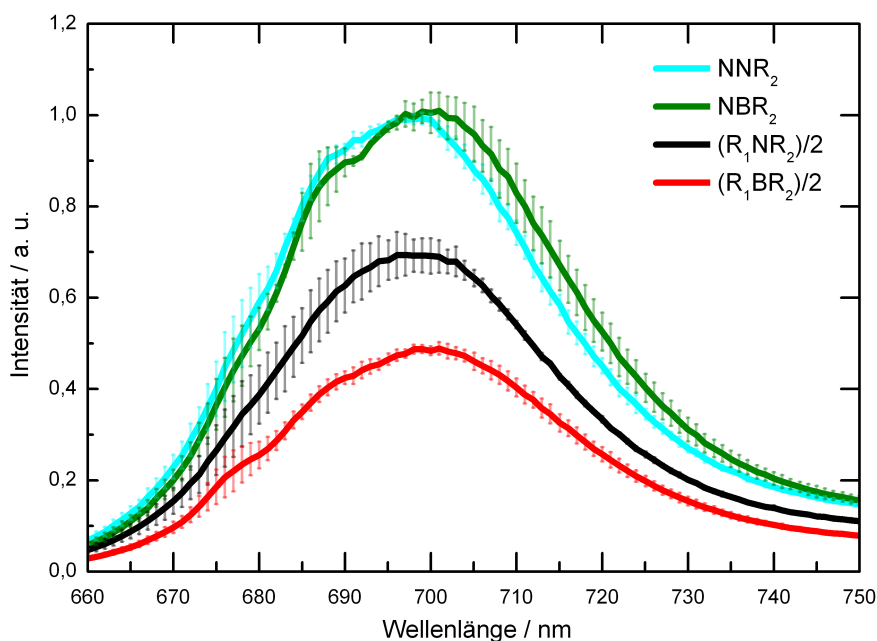


Abbildung 5.58: Normierte Emissionsspektren der Kombination I-a von NNR_2 , NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2 . NNR_2 wurde auf sein Maximum normiert, die übrigen Spektren dazu in Relation gesetzt. R_1NR_2 und R_1BR_2 wurden aus oben genannten Gründen halbiert.

Von NNR_2 zu NBR_2 kommt es bei annähernd gleicher Intensität zu einem Maximumwellenlängen-Unterschied von etwa 4 nm. Erst in der Zweierkombination R_1NR_2 kommt es zu einem Intensitätsabfall von etwa 30 %, bei der Dreierkombination R_1BR_2 sinkt die Intensität sogar um 51 %.

Um die jeweilige Abschwächung quantitativ besser erfassen zu können, werden im Folgenden Differenzspektren gebildet (s. Abbildung 5.59). Dafür werden nur die drei hier relevanten Spektren R_1BN bzw. NBR_2 , R_1NR_2 sowie R_1BR_2 verwendet und das R_1NR_2 -Spektrum jeweils von allen drei subtrahiert. Dies hat den Vorteil, dass mögliche Wechselwirkungen zwischen R_1 und R_2 als Bezugspunkt gewählt werden. Da somit allerdings die Differenz des Quenchingeffektes negativ ist, werden die Werte mit (-1) multipliziert, wodurch sie qualitativ besser mit dem Anstieg aus den Absorbanzspektren vergleichbar sind.

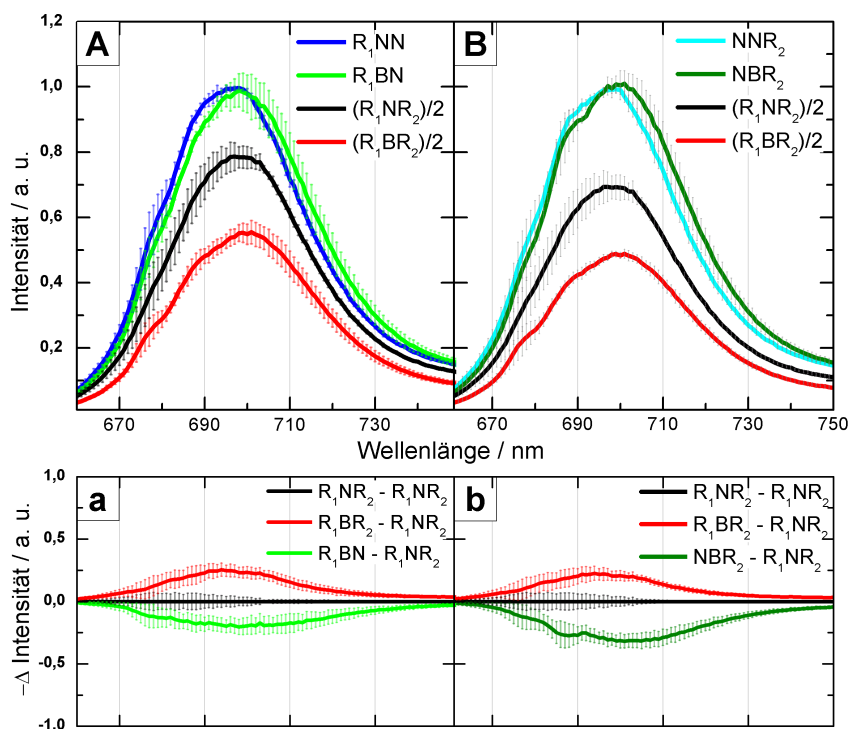


Abbildung 5.59: Darstellung der wichtigsten Emissionen von Kombination I-a mit Differenzspektren. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden die Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 in den Graphen **a** und **b** in kurzer Form benannt. Es handelt sich dennoch um die halbierten Werte. **A:** normierte Emissionswerte aus Abb. 5.57; **B:** normierte Emissionswerte aus Abb. 5.58 **a:** errechnete Differenzspektren aus **A**; **b:** errechnete Differenzspektren aus **B**.

Das rote Differenzspektrum zeigt in beiden Fällen einen klaren, etwa gleich hohen Anstieg. Der negative Peak in den grünen Differenzspektren ist ebenso klar erkennbar und in R_2 stärker ausgeprägt. Diese Trends zeichneten sich zwar bereits in den vorherigen Abbildungen 5.57 und 5.58 ab, doch durch die Art der Darstellung sind sie nun einfacher optisch vergleichbar.

Um zu untersuchen, inwiefern ein größerer Abstand Einfluss auf das Emissionsverhalten der roten Farbstoffe hat, wird im Folgenden auf Kombination II-a eingegangen. Hierfür stellt Abbildung 5.60 zunächst die Spektren von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 sowie das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) gegenüber.

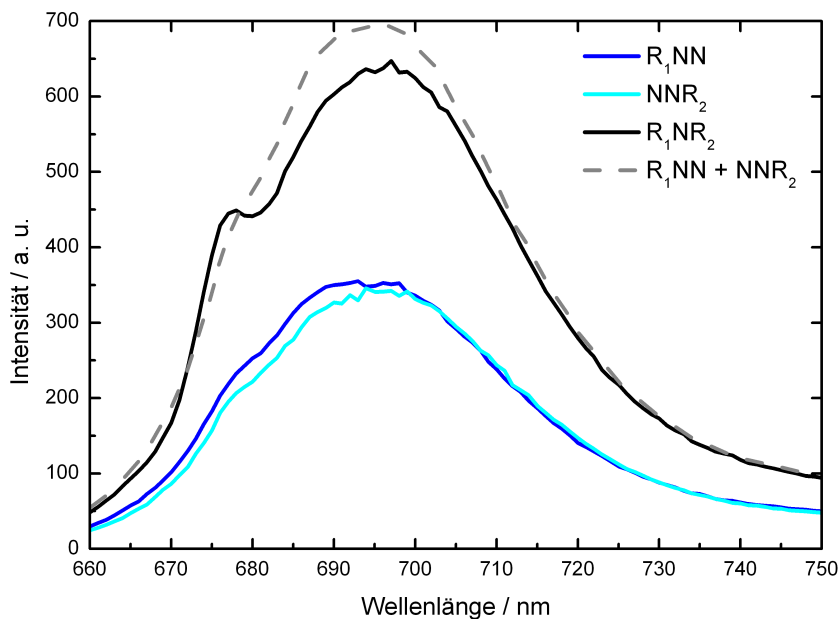


Abbildung 5.60: Emission der Proben R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 der Kombination II-a sowie das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$).

Dem berechneten Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) zufolge sollte das Emissionsspektrum von R_1NR_2 etwa 7 % intensiver vorliegen. Der Unterschied beider Spektren lässt sich wahrscheinlich analog zu Kombination I-a auf Wechselwirkungen zwischen R_1 und R_2 beziehen, wenngleich auch geringer ausgeprägt. Dieser Trend wird in Abbildung 5.61 bestätigt, in der alle relevanten Spektren für R_1 dargestellt werden.

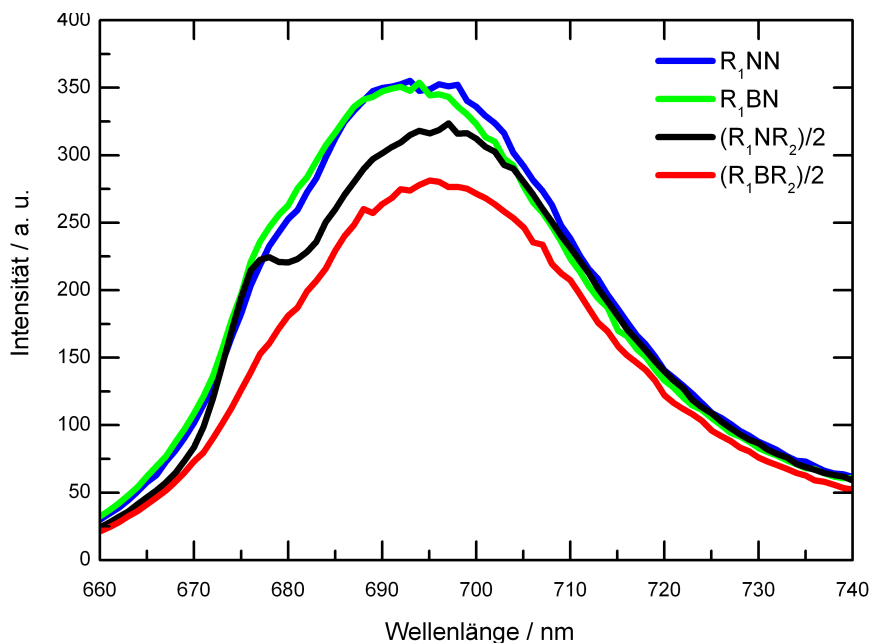


Abbildung 5.61: Emission von R_1NN , R_1BN , R_1NR_2 und R_1BR_2 der Kombination II-a. R_1NR_2 und R_1BR_2 wurden auch hier wieder halbiert.

Es findet ausgehend von R_1NN und R_1BN , die beide annähernd gleich intensiv emittieren, eine schrittweise Abschwächung über R_1NR_2 zu R_1BR_2 statt. Auch dies war zuvor in Kombination I-a stärker erkennbar. Für den zweiten roten Farbstoff R_2 sehen die Verhältnisse der Spektren zueinander in den relevanten Bereichen ähnlich aus (s. Abbildung 5.62). Die schrittweise Ab-

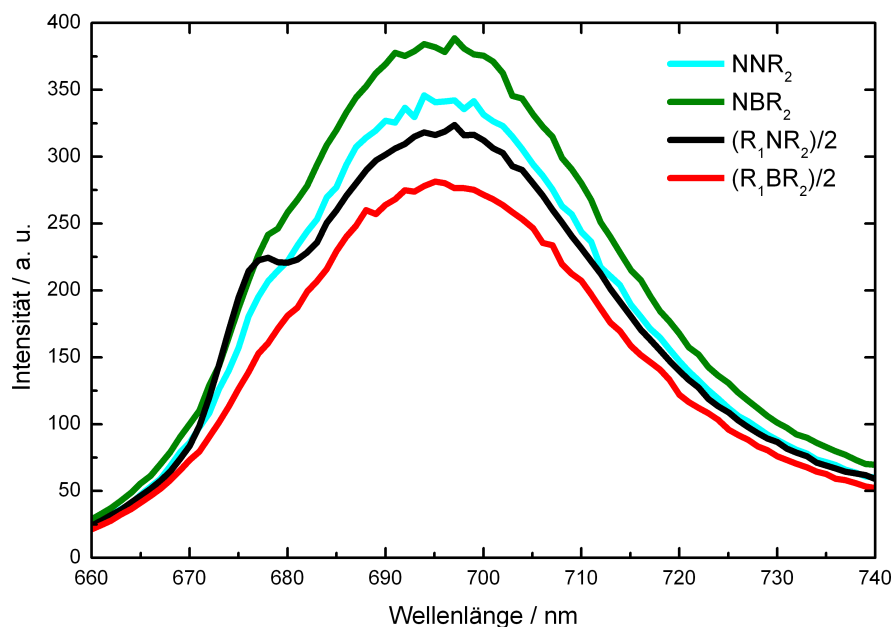


Abbildung 5.62: Emissionen von NNR_2 , NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2 der Kombination II-a. R_1NR_2 und R_1BR_2 wurden auch hier wieder halbiert.

stufung der Intensität von NNR_2 über R_1NR_2 zu R_1BR_2 findet hier auch statt. Allerdings liegt das NBR_2 -Spektrum unerwartet höher als das von NNR_2 . Auf mögliche Ursachen hierfür wird in der Diskussion eingegangen.

Um auch in dieser Kombination die interessanten Anstiege quantitativ erfassen zu können, werden, wie in Abbildung 5.10 gezeigt, aus den relativ auf Eins normierten Spektren wiederum Differenzspektren gebildet (Abbildung 5.63). Es sind für beide roten Farbstoffe positive Anstiege in den Differenzspektren erkennbar. Diese sind allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als in der räumlich näheren Anordnung der gleichen Farbstoffe (Kombination I-a), wie bereits in den Spektren 5.60 bis 5.62 erkennbar war.

Bisher wurden homochromophore Farbstoffkombinationen untersucht, die sich im Sinne der *Up*- und *Downconversion* ähnlich sind und durch die räumliche Anordnung der Farbstoffe an der DNA unterscheiden. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Farbstoffkombinationen gezeigt, in denen B, R_1 und R_2 ebenso nah beieinander liegen wie in Gruppe I, sich aber energetisch in ihren Werten für Absorbanz und Emission unterscheiden (Gruppe III). Als repräsentative

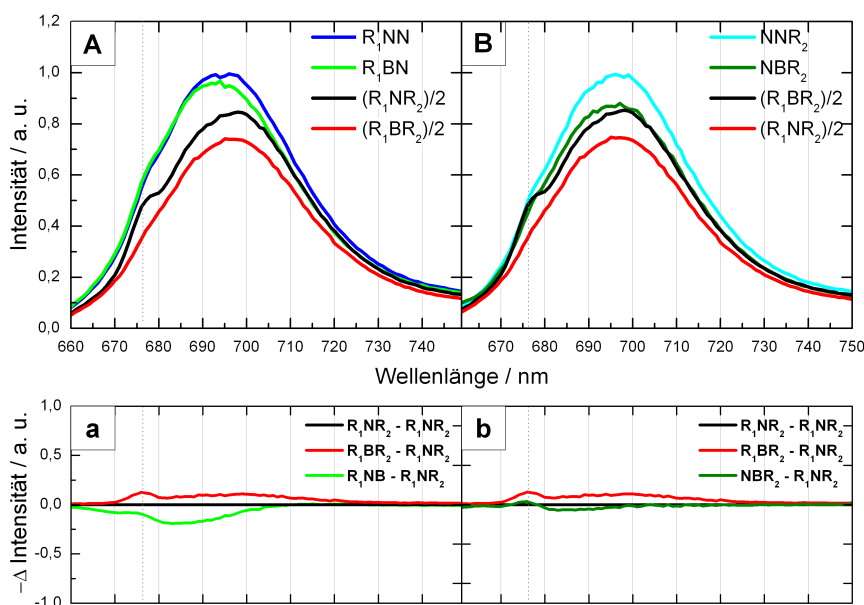


Abbildung 5.63: Darstellung der wichtigsten Emissionsspektren der Kombination II-a mit Differenzspektren. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden die Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 in den Graphen **a** und **b** in kurzer Form benannt. Es handelt sich jedoch um die halbierten Werte. Die gestrichelte Linie markiert den Anregungspeak. **A:** normierte Emissionsspektren aus Abb. 5.61; **B:** normierte Emissionsspektren aus Abb. 5.62; **a:** errechnete Differenzspektren aus **A**; **b:** errechnete Differenzspektren aus **B**

Probe wird wie in den Kapiteln zuvor die Kombination III-a gewählt.* Begonnen wird in Abbildung 5.64 mit dem Vergleich der Emissionen der Proben, die lediglich die R-Chromophore beinhalten.

Die Intensitäten von R_1NN und NNR_2 unterscheiden sich mit etwa 25 % merklich voneinander, obwohl es sich um den gleichen Farbstoff handelt. Zudem liegt auch das Spektrum der Probe R_1NR_2 im Vergleich zum berechneten Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) stark verringert vor. Dies deutet auch in dieser Kombination auf starke Wechselwirkungen zwischen R_1 und R_2 hin. Ob diese Interaktion durch die Anwesenheit von Pyren verstärkt werden kann, soll Abbildung 5.65 zeigen.

In beiden Graphen kommt es zu einem großen Intensitätsabfall, sobald beide roten Farbstoffe gleichzeitig in der Probe vorhanden sind. Die Anwesenheit von Pyren sorgt dagegen für keinerlei Veränderungen in den Spektren. Daher werden die positive Anstiege in den Differenzspektren ebenfalls gering sein (Abbildung 5.66).

* R_1 und R_2 : Alexa Fluor 790

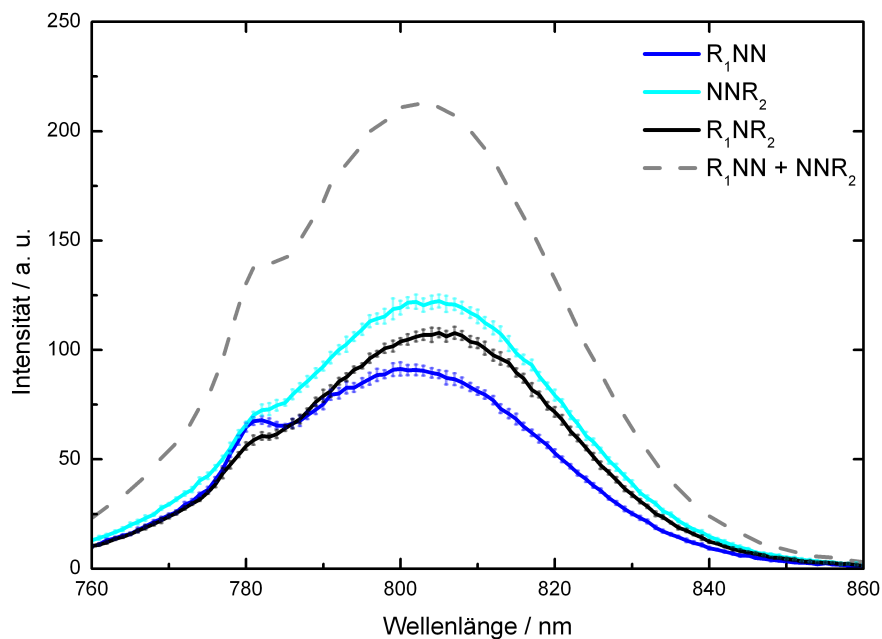


Abbildung 5.64: Emission der Proben R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 der Kombination III-a sowie das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$).

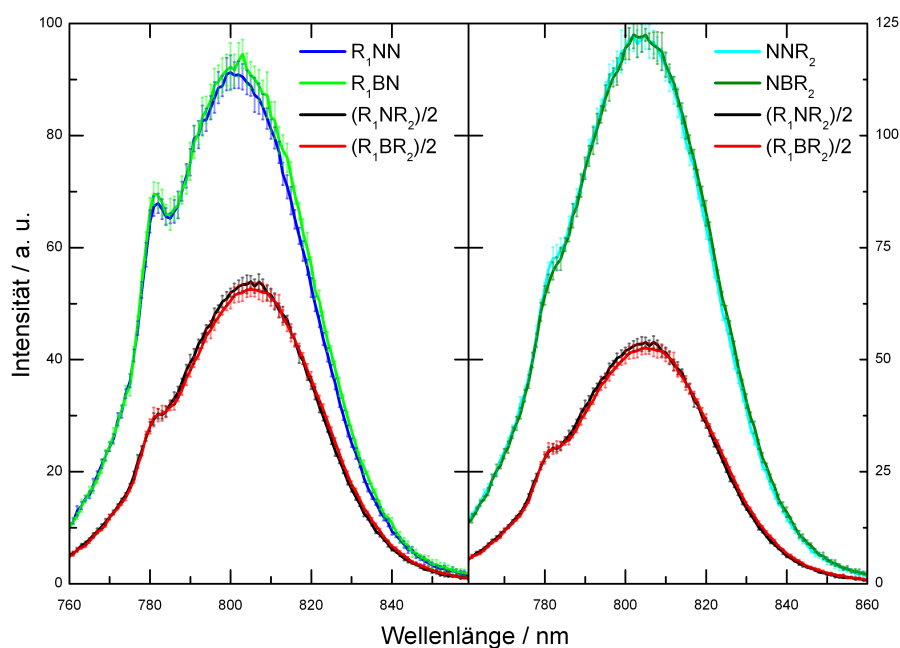


Abbildung 5.65: Einfluss von Pyren auf die R-enthaltenen Proben der Kombination III-a.

Die räumliche Nähe der Farbstoffe scheint also nicht alleine für ein starkes alleiniges *Quenching* des R_1BR_2 -Spektrums verantwortlich zu sein, sondern auch die energetische Ähnlichkeit der Farbstoffe untereinander. Daher soll letztes Beispiel die heterochromophore Kombination I-b* betrachtet werden, in der R_1 und R_2 4 bp auseinander liegen, aber dieses Mal in unterschiedlichen Bereichen absorbieren und emittieren. In Abbildung 5.67 kann daher zunächst auf

* R_1 : Cy5.5, R_2 : Dy-700

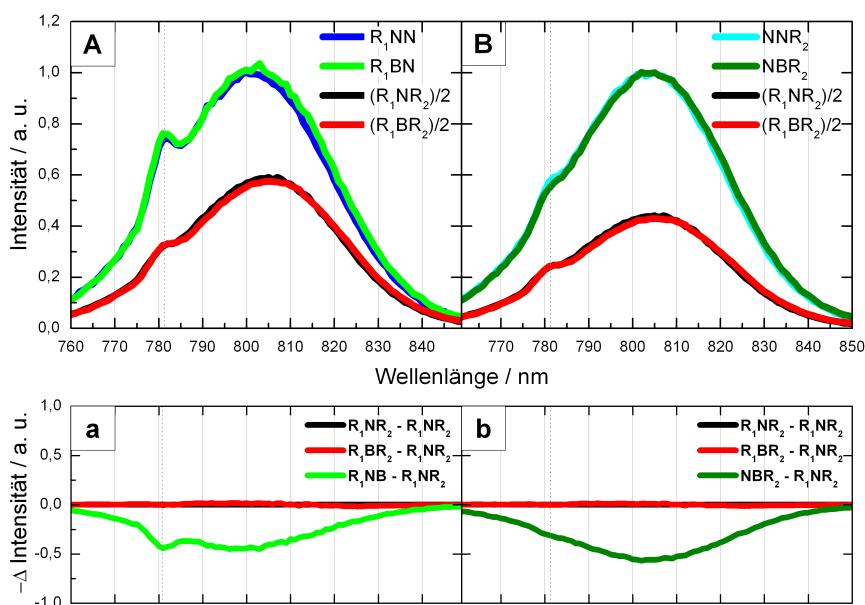


Abbildung 5.66: Darstellung der wichtigsten Emissionsspektren der Kombination III-a mit Differenzspektren. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurden die Proben R_1NR_2 und R_1BR_2 in den Graphen **a** und **b** in kurzer Form benannt. Es handelt sich jedoch um die halbierten Werte. Die gestrichelte Linie markiert den Anregungspeak. **A:** normierte Emissionsspektren aus Abb. 5.61; **B:** normierte Emissionsspektren aus Abb. 5.62; **a:** errechnete Differenzspektren aus **A**; **b:** errechnete Differenzspektren aus **B**

das Verhalten der beiden roten Farbstoffe eingegangen werden, wenn sie bei ihrer jeweiligen Absorbanzmaximums-Wellenlänge angeregt werden, ohne dass Berechnungsschritte notwendig sind.

Durch das schwach ausgeprägte Emissionsvermögen von NNR_2 bei dieser Wellenlänge verläuft das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) nahezu identisch mit dem von R_1NN . Erst im Bereich der R_2 -Emission kommt es zu Unterschieden. Dies lässt eine Verwendung der R_1NR_2 - und R_1BR_2 -Spektren zu, ohne den Einfluss von R_2 bei diesem Wellenlängenbereich beachten zu müssen (wie beispielsweise eine Halbierung der Werte zuvor). Das R_1NR_2 -Spektrum ist im Vergleich zu R_1NN um etwa 30 % reduziert .

Um das Verhalten von R_2 zu betrachten, werden dieselben Proben beim Absorbanzmaximum von NNR_2 angeregt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 5.68 veranschaulicht. R_1NN weist hier eine stärkere Emissionsbande auf als zuvor NNR_2 , sodass hier das Summenspektrum aus R_1NN und NNR_2 leicht erhöht zu NNR_2 verläuft (+5 %). Das R_1NR_2 -Spektrum verläuft dagegen um etwa den gleichen Wert abgeschwächt darunter.

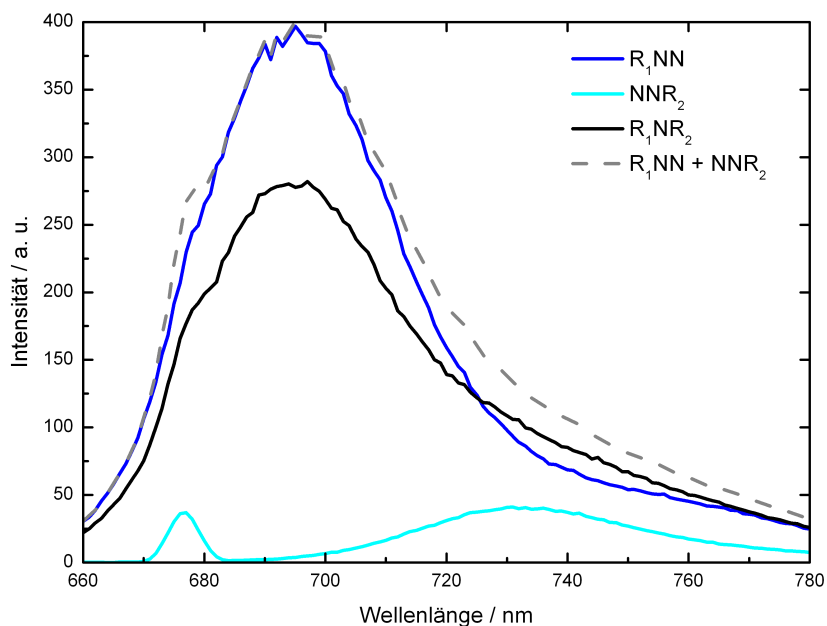


Abbildung 5.67: Emissionsspektren von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 und dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) der Kombination I-b bei Anregung am R_1NN -Absorbanzmaximum. Die vertikale gestrichelte Linie stellt die Anregungswellenlänge dar.

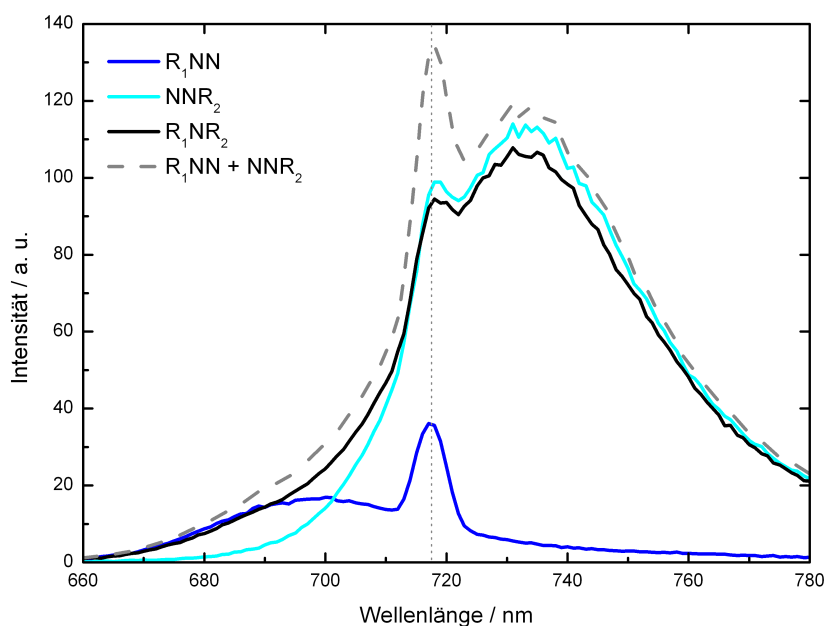


Abbildung 5.68: Emissionsspektren von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 und dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) der Kombination I-b bei Anregung am NNR_2 -Absorbanzmaximum. Die gestrichelte Linie stellt die Anregungswellenlänge dar.

In der folgenden Abbildung 5.69 sind die wichtigsten Spektren dieser Kombination zusammengefasst. Sie wurden wiederum auf das jeweilige R-Maximum normiert und um ihre sich daraus ergebenden Differenzspektren ergänzt.

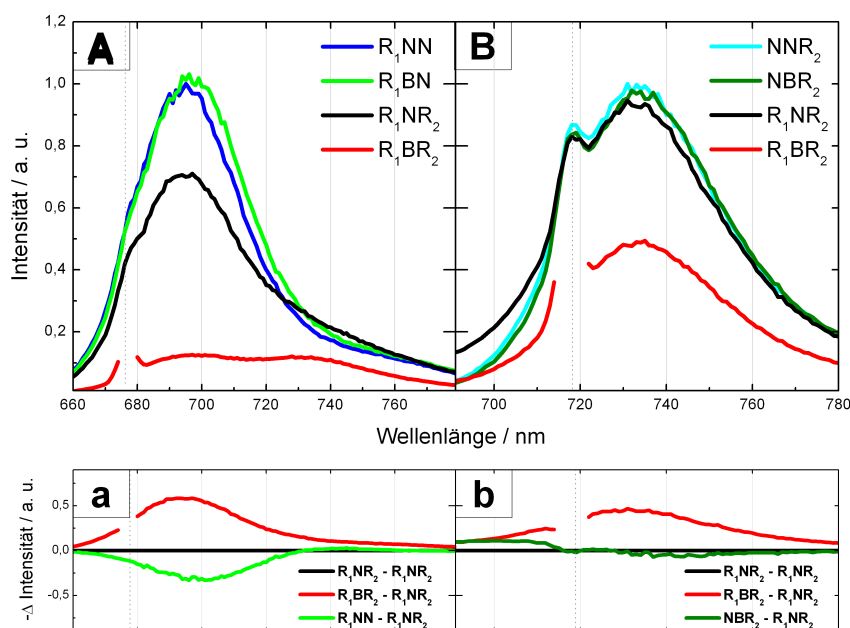


Abbildung 5.69: Emissionsspektren von R_1NN , NNR_2 , R_1BN , NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2 der Kombination I-b sowie die daraus abgeleiteten Differenzspektren. Die gestrichelte graue Linie spiegelt den Anregungspeak wieder. **A:** normierte Emmissionswerte aus Abb. 5.61; **B:** normierte Emmissionswerte aus Abb. 5.62 **a:** errechnete Differenzspektren aus **A**; **b:** errechnete Differenzspektren aus **B**

Hier sind zwei Besonderheiten klar erkennbar: Zum einen kommt es im Bereich der R_1 -Anregung im Graph 5.69 A zur bereits genannten Abschwächung des R_1NR_2 -Spektrums, welche aber in Graph 5.69 B nicht stattfindet. Dadurch bilden in Graph 5.69 b das grüne und das schwarze Differenzspektrum annähernd beide die Nulllinie, wohingegen in Graph 5.69 a ein klarer negativer Peak des grünen Differenzspektrums erkennbar ist. Zum anderen findet in beiden Anregungsbereichen zum R_1BR_2 -Spektrum hin ein signifikanter Intensitätsabfall statt. Dies schlägt sich in hohen Peaks der Differenzspektren nieder.

Da keine der anderen Kombinationen stärkere Effekte aufwies, kann an dieser Stelle in Abbildung 5.70 eine Zusammenfassung aller Kombinationen der Gruppe I gezeigt werden. Bis auf Kombination I-c sind in allen Graphen hohe Peaks im roten Differenzspektrum erkennbar, welches den Unterschied zwischen R_1NR_2 und R_1BR_2 darstellt. Zum Vergleich dazu werden in Abbildung 5.71 und 5.72 die Spektren der Gruppen II und III gezeigt. In den meisten Kombinationen sind die Anstiege sehr gering bis nicht vorhanden. Die Ausnahmen bilden Kombination II-d und III-b: Erstere besitzt lediglich im linken Graphen einen ausgeprägten Anstieg des roten Differenzspektrums. Kombination III-b dagegen besitzt Anstiege, die in ihrer Ausprägung der Kombination I-c ähneln.

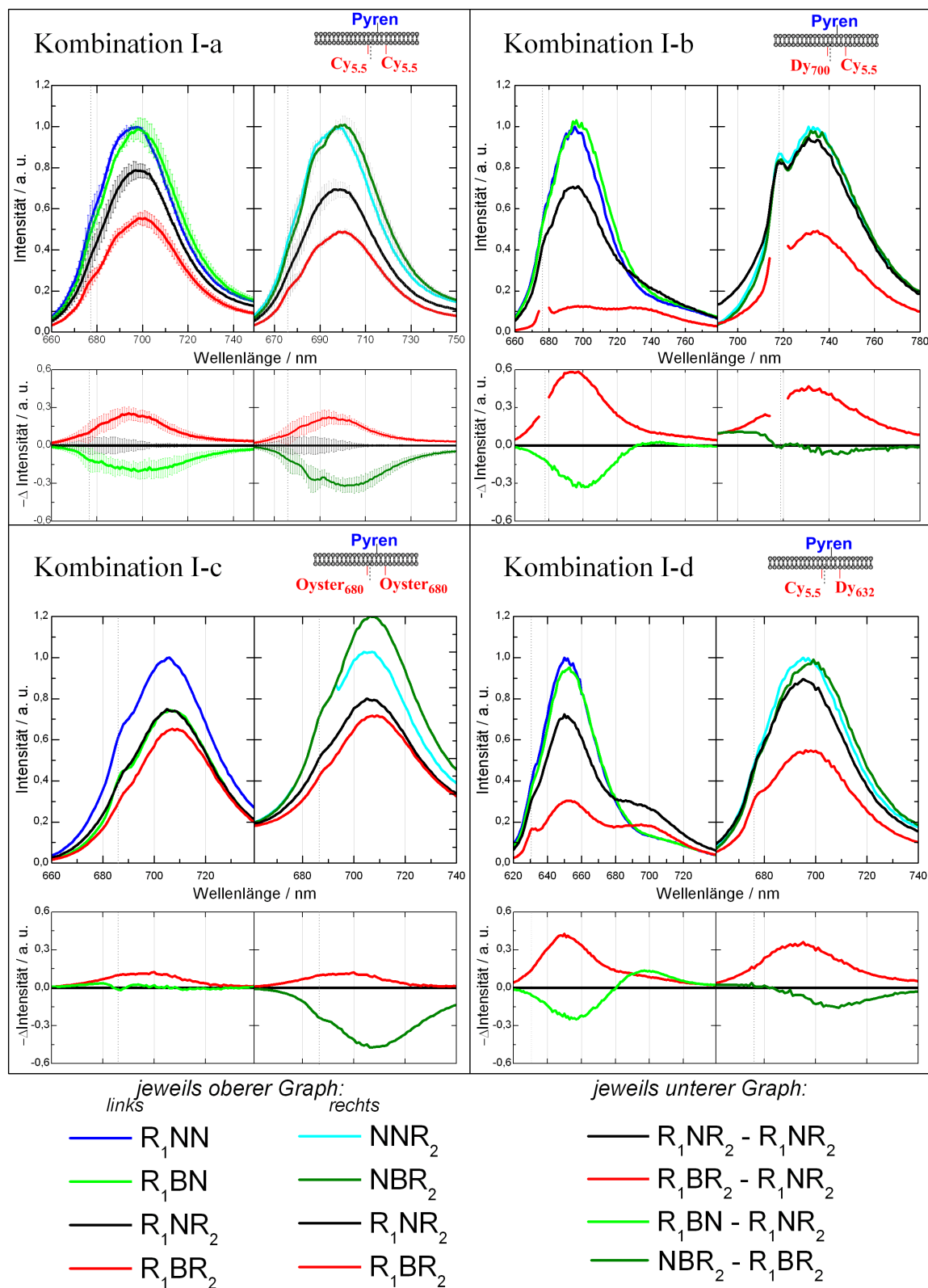


Abbildung 5.70: Übersicht aller Kombinationen der Gruppe I. Der linke Graph stellt jeweils den Anregungsbereich von R_1 dar, der rechte den von R_2 . Bei den gestrichelten Linien handelt es sich wie zuvor um die Wellenlänge des Anregungspeaks.

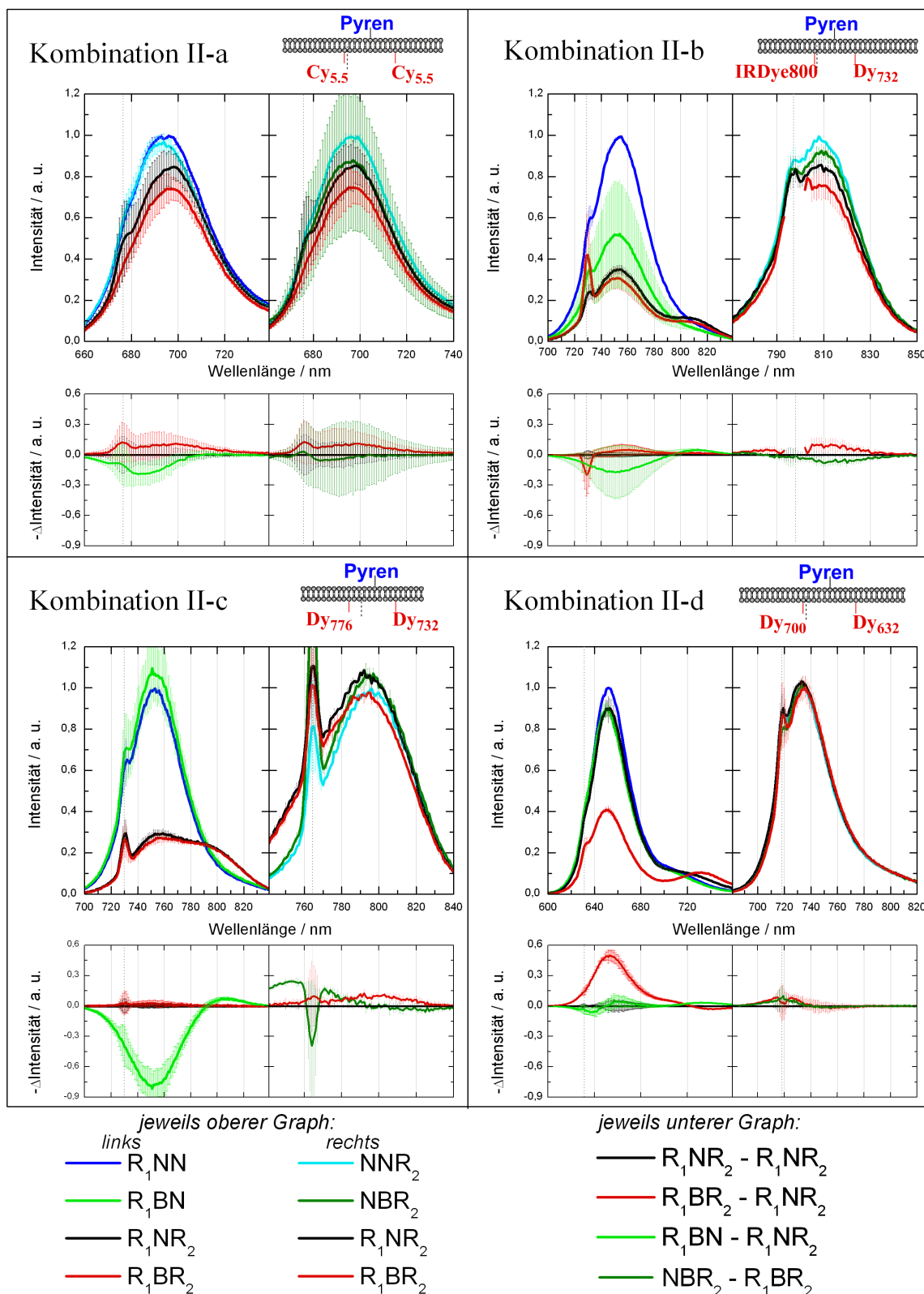


Abbildung 5.71: Übersicht aller Kombinationen der Gruppe II. Der linke Graph stellt jeweils den Anregungsbereich von R_1 dar, der rechte den von R_2 . Bei den gestrichelten Linien handelt es sich wie zuvor um die Wellenlänge des Anregungspeaks.

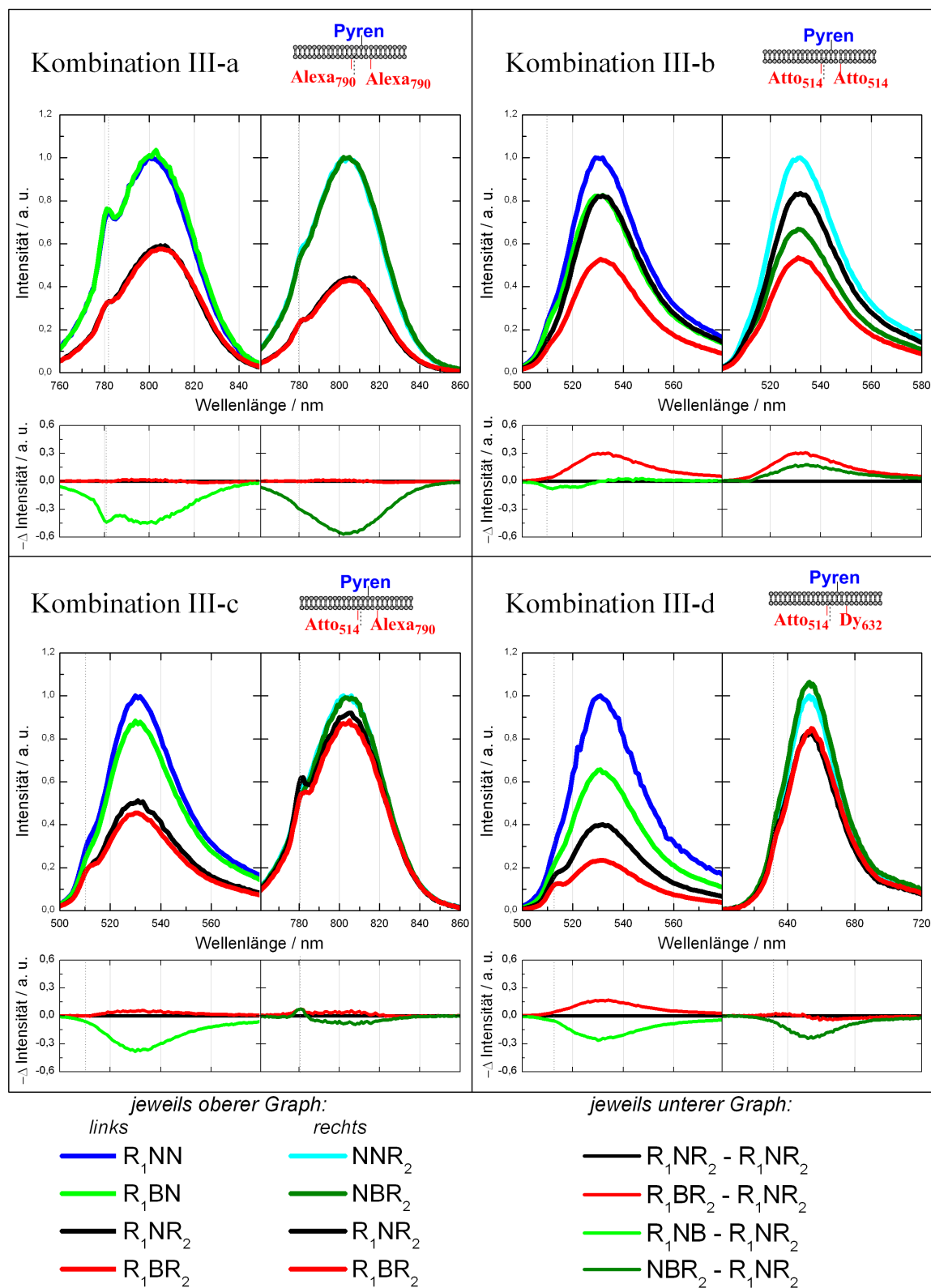


Abbildung 5.72: Übersicht aller Kombinationen der Gruppe III. Der linke Graph stellt jeweils den Anregungsbereich von R_1 dar, der rechte den von R_2 . Bei den gestrichelten Linien handelt es sich wie zuvor um die Wellenlänge des Anregungspeaks.

Um die Größenordnungen aller drei Gruppen quantitativ erfassen zu können, zeigt die Abbildung 5.73 den Anstieg des roten Differenzspektrums in allen Kombinationen.

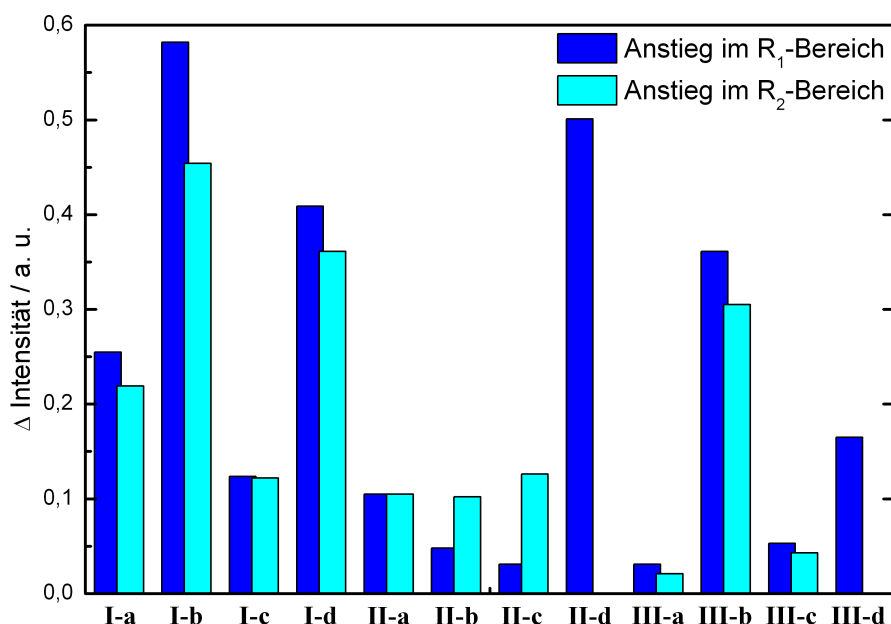


Abbildung 5.73: Maximale Peakhöhen der roten Emissions-Differenzspektren aller drei Gruppen.

Gruppe I: Abstand 4 bp, energetisch ähnlich; **Gruppe II:** Abstand 8-10 bp, energetisch ähnlich; **Gruppe III:** Abstand 4 bp, energetisch abweichend

Die Zuordnung ist weniger klar als in den Absorbanzwerten, doch Gruppe I weist in der Gesamtheit noch immer die größten Werte auf. Dies wird vor allem deutlich, wenn lediglich der Anstieg im R₂-Bereich betrachtet wird, da hier keine Verfälschungen der Werte durch einen Energietransfer (wie im R₁-Bereich durch einen Transfer von R₁ auf R₂) stattfinden. Da Kombination I-c die einzige Probe der Gruppe I ist, die keinen Cy5.5-Farbstoff enthält, ist dies möglicherweise ein Grund für die gleichartige Ausprägung des Anstieges zu Gruppe II. Die Besonderheit von Kombination III-b im Quenchingverhalten wird in dieser Darstellung noch einmal besonders deutlich und im Kapitel 6.2 näher diskutiert.

5.2.5 Emissionsspektren im blauen Bereich

In diesem Bereich wird die Emission von Pyren betrachtet. Sollte es Wechselwirkungen zwischen B und den beiden roten Chromophoren geben, so sollte dies auch hier in den Emissionsspektren sichtbar werden. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Kombinationen untereinander wurde stets eine Anregungswellenlänge von 345 nm gewählt (s. auch Kapitel 5.1.2).

Da es auf die Verhältnisse der vier wichtigsten Spektren NBN, R_1BN , NBR_2 und R_1BR_2 ankommt, wird auf eine Spektrendarstellung für einzelne Kombinationen verzichtet und stattdessen eine Gesamtübersicht der drei Kombinationsgruppen gezeigt. Zunächst werden die Ergebnisse der energetisch ähnlichen Kombinationen mit geringen Abstand präsentiert (Gruppe I, Abbildung 5.74).

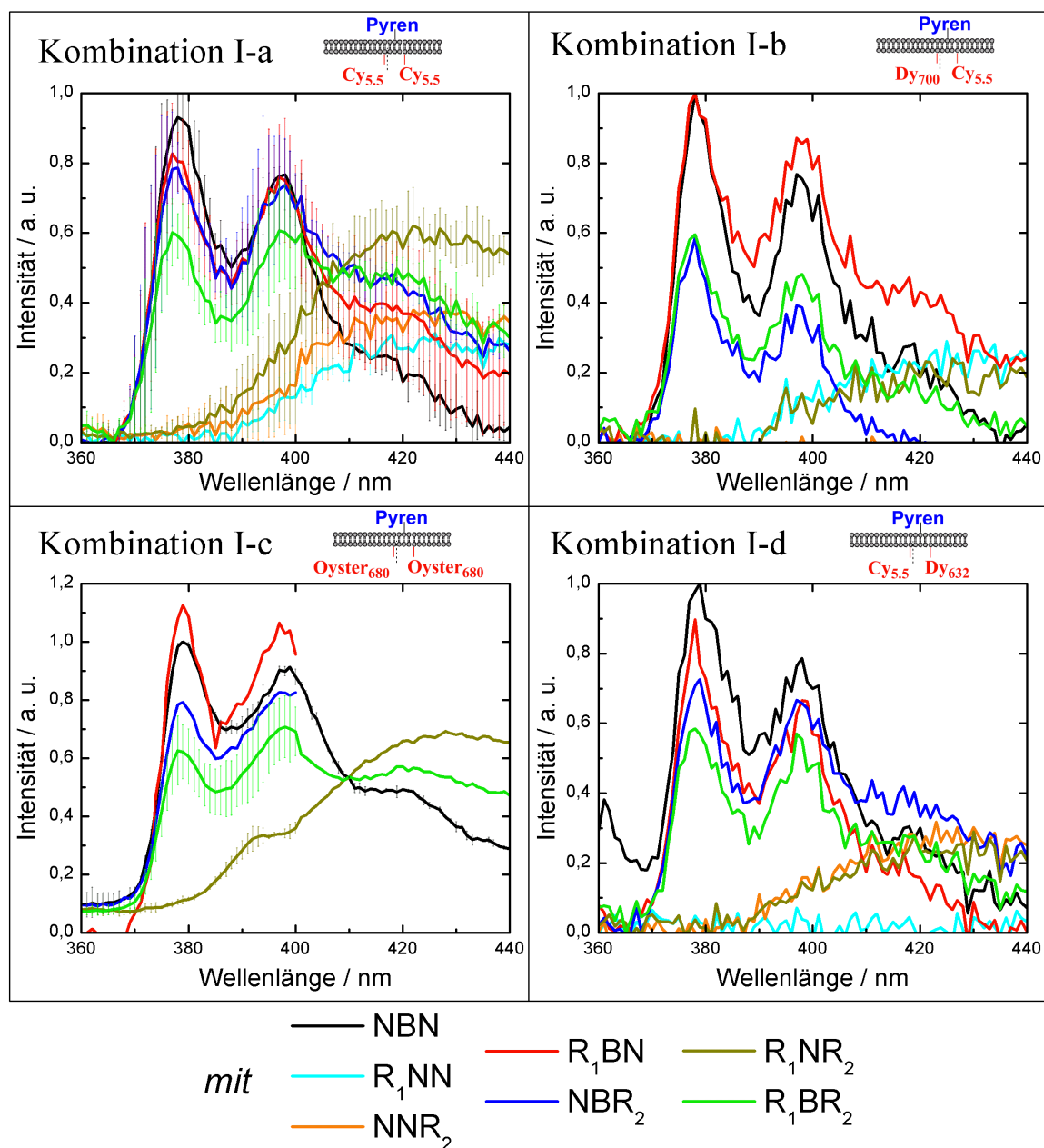


Abbildung 5.74: Darstellung der Emissionsspektren der Kombinationen aus Gruppe I nach Anregung mit 345 nm.

Es ist erkennbar, dass die Probe R_1BR_2 jeweils unter denen von R_1BN und NBR_2 liegt. Nur Kombination I-b stellt hierbei eine Ausnahme dar. Hier ähneln die Spektren eher den anderen Kombinationen aus Gruppe II (Abbildung 5.75).

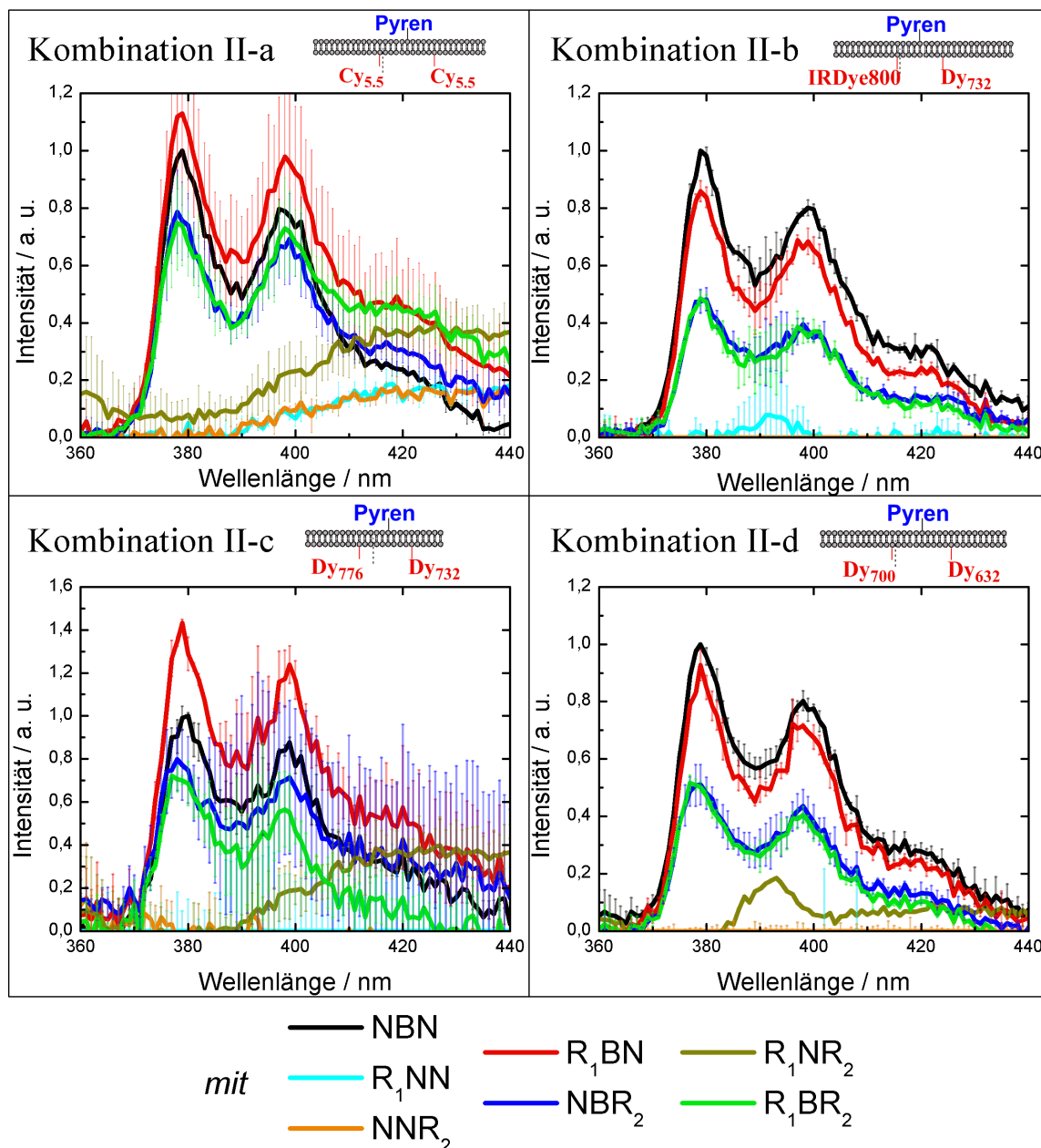


Abbildung 5.75: Darstellung der Emissionsspektren der Kombinationen aus Gruppe II nach Anregung mit 345 nm.

Es ist erkennbar, dass die Spektren von R_1BR_2 konsequent auf derselben Höhe liegen wie die von NBR_2 . Auffällig ist dabei auch hier, dass in zwei der vier Kombinationen das Spektrum von R_1BN höher liegt als das von NBN .

Als letzte Zusammenfassung zeigt Abbildung 5.76 die Ergebnisse der Gruppe III. Hier lässt sich ebenfalls kein klarer Trend erkennen. Allerdings muss bei allen Spektren betont werden, dass sie einer starken Fehlerschwankung unterliegen, sodass die hier gewonnenen Ergebnisse aller Kombinationen mit Einschränkungen zu verwenden sind.

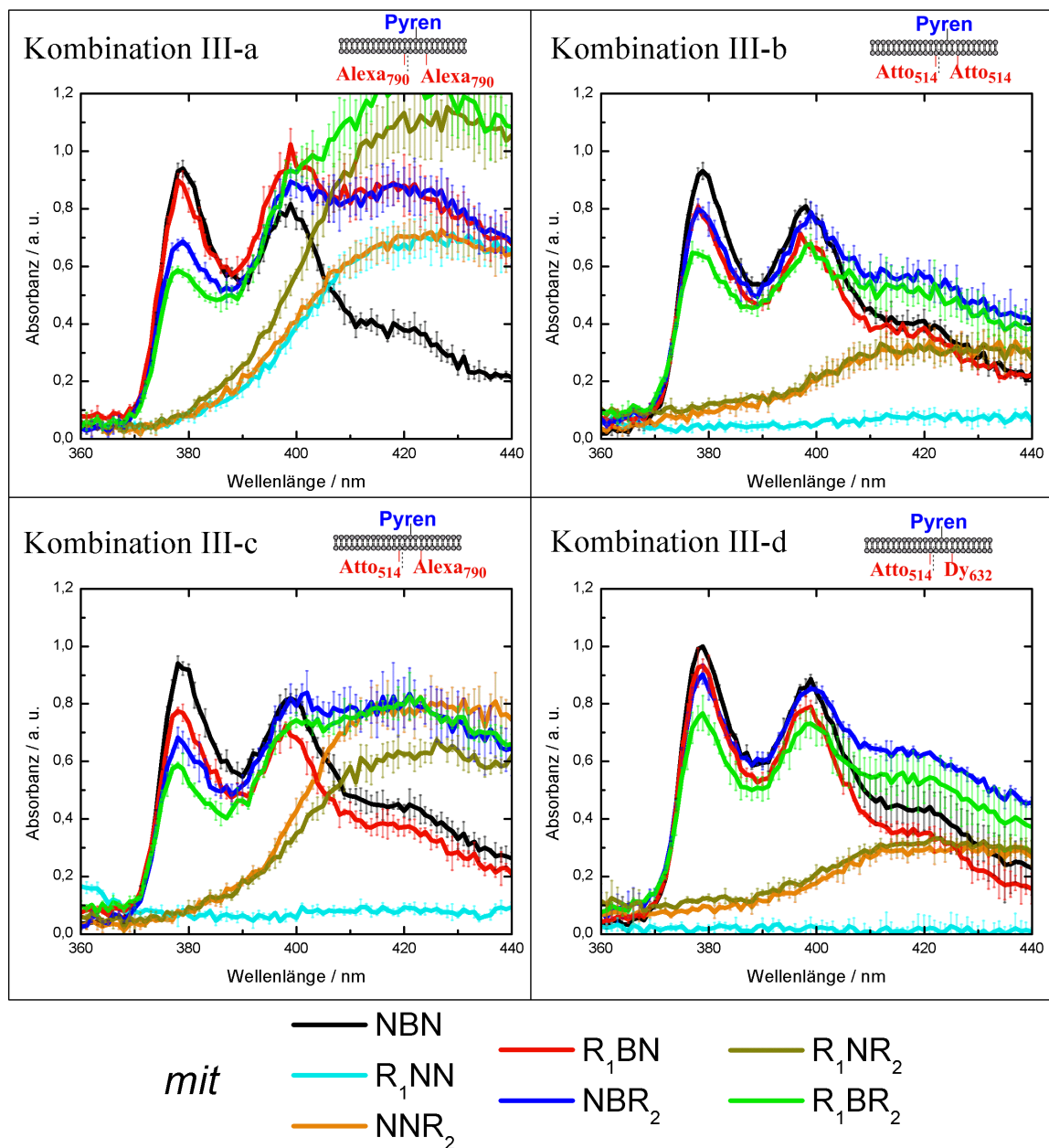


Abbildung 5.76: Darstellung der Emissionsspektren der Kombinationen aus Gruppe III nach Anregung mit 345 nm.

6 Diskussion

6.1 Vorausgehende Untersuchungen

Die Farbstoffe zeigten in den Absorbanz- und Emissionsspektren umgebungsspezifische Maximaverschiebungen, welche in Kapitel 6.1.1 diskutiert werden. Vor allem die Hinweise für eine mögliche Interkalation des Pyrens in die DNA (Seite 133) könnten wichtige Folgen zur Erklärung des in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Seitenbandeneffektes haben (Seite 70). Im Kapitel 6.1.2 wird auf die energetischen Ähnlichkeiten der Farbstoffe und ihre Bedeutung für die Größe des Seitenbandeneffektes eingegangen. Um letztendlich auszuschließen, dass für die auftretenden Effekte lediglich Konzentrationsschwankungen verantwortlich sind, werden diese in Kapitel 6.1.3 besprochen.

6.1.1 Absorbanz- und Emissionswerte von B, R₁ und R₂

Das Zusammentreffen aller drei Farbstoffe führte zu Wechselwirkungen untereinander und dadurch zu leichten bathochromen Verschiebungen der Absorbanz- und Emissionsmaxima von Pyren. Diese liegen jedoch im gleichen Bereich wie die Standardabweichung (weniger als 0,5 %), sind damit vernachlässigbar und können in allen Kombinationen als praktisch konstant angenommen werden. Der Anregungswellenlängentest hat gezeigt, dass Pyren eine höhere Fluoreszenz aufweist, wenn mit 345 nm angeregt wird statt mit 350 nm, obwohl dieses das Absorbanzmaximum darstellt. Der Grund hierfür kann in einem typischen Verhalten von Pyren liegen: Wie bereits in Kapitel 3.1 vorgestellt, neigt Pyren aufgrund seiner Nukleobasen-Ähnlichkeit zur Interkalation in die DNA. Wenn sich das Pyren durch die Ausbildung einer physikalischen Bindung in der Helix befindet, verändert sich sein spektrales Verhalten: Die Fluoreszenz-Emission wird gequencht und die Absorbanzmaxima werden um ca. 8 nm^[135] bathochrom verschoben.^[135,136] Da das Absorbanzmaximum für freies Pyren bei zwischen 340 nm^[106] und 345 nm Ibanez.1980 liegt, es in dieser und vorherigen Arbeiten^[104] auf etwa 350 nm bestimmt werden konnte, könnte dies bedeuten, dass das ein Teil des Pyrens interkaliert ist. Da dieser Teil aber nicht zur Fluoreszenz beiträgt, stammt folglich die gemessene Fluoreszenzintensität nur von dem nicht interkalierten Teil der DNA, welcher eine hypsochromere Anregungsenergie benötigt als das gemessene Absorbanzmaximum. Die Fluoreszenzmaxima lagen daher un-

abhängig von der Anregungswellenlänge wie erwartet bei 378 nm und 397 nm. Eine leichte hypsochrome Verschiebung wie in den Absorbanzspektren lag auch hier vor, sobald alle drei Farbstoffe zugegen waren.

Bei den R-Farbstoffen ist eine generelle Aussage über die Gründe der unterschiedlichen Maximaverschiebungen schwierig, da deren Ausmaß und Richtung von den einzelnen Farbstoffen und deren Position zu anderen Farbstoffen abhing. In den Emissionsspektren konnten viele der Trends der Absorbanz-Maximaverschiebung bei Anwesenheit aller drei Farbstoffe bestätigt werden: bei den meisten der Kombinationen kam es zu einer Verschiebung in dieselbe Richtung wie zuvor in den Absorbanzspektren. Alle Verschiebungen liegen jedoch in so kleinem Maße vor, dass es sich wahrscheinlich lediglich um Polarisationswechselwirkungen handelt, die beispielsweise auch bei unterschiedlichen Lösungsmitteln auftreten. Auf eine genauere Betrachtung wird daher verzichtet, da eine Klärung der einzelnen Verschiebungen nicht zur Aufklärung des Seitenbandeneffektes beitragen würde.

6.1.2 Abgeleitete Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionswerte

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die praktisch gemessenen Maxima meist von den theoretischen unterscheiden. Dies ist nicht unerwartet, da die meisten auf Herstellerseiten angegebenen spektralen Daten lediglich Richtwerte sind und davon abhängen, in welchem Lösungsmittel gemessen wurde und an welcher Umgebung der Farbstoff gebunden ist. Zwar führen die praktischen Werte dazu, dass zuvor getätigte Zuordnungen für *Up*- und *Downconversion* nicht mehr stimmen, doch ist erkennbar, dass sich die Werte noch immer energetisch sehr ähnlich sind. Dies liegt darin begründet, dass die Verschiebung der Maxima insgesamt nur eine Veränderung der Energiewerte um maximal $0,05 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ hervorrief.

Bemerkenswert dabei ist, dass der größte Seitenbandeneffekt in der Kombination auftrat, in der die Summe der Anregungsniveaus der R-Farbstoffe energetisch besonders ähnlich zu dem des B-Farbstoffes liegt (Kombination I-b, $R_1 + R_2$: $2,87 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, B: $2,86 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, s. Tabelle 5.5, Seite 64).

6.1.3 Konzentrationsabgleich

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Konzentrationen der einzelnen Proben untereinander mit bis zu 12 % in einem gerade noch annehmbaren Bereich liegen. Unter Vernachlässigung der Kombinationen II-b und II-c besitzen die Schwankungen sogar nur Werte von $(4,2 \pm 1,5) \%$. Die Herstellungsmethode per Vorlösung scheint daher eine verlässliche Methode zu sein, um kleine Probenvolumina in geringen Konzentrationen herzustellen.

Das Absorbanzmaximum der DNA konnte zu $(259 \pm 1) \text{ nm}$ bestimmt werden, wobei Pyren einen hypsochromen Einfluss ausübt: Alle Proben, die Pyren enthalten, haben einen um 0,5 nm verschobenes Maximum gegenüber der N-Proben zur Folge. Dies könnte in der Neigung des Pyren zur Interkalation begründet sein.

Zudem weisen alle Absorbanzspektren der Pyren-enthaltenden Proben in Gruppe I und II eine niedrigere Absorbanz auf als die restlichen, was an einer nicht richtig eingestellten Stammlösung der B-Probe seitens des Herstellers liegen kann: Sollte die Stammkonzentration des Pyren-gelabelten Stranges unter $0,1 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ gelegen habe, könnte dies eine durchweg niedrigere Konzentration zur Folge haben. Nicht davon betroffen sind die Proben des gleichen, ungelabelten Stranges. Hier kann die Konzentration anders eingestellt worden sein, denn die Produktionswege für beide Stränge (gelabelt und ungelabelt) laufen unabhängig voneinander ab. Zudem tritt dieser Effekt nicht bei den Proben der Gruppe III auf, für die eine frische Pyren-Stranglösung bestellt wurde.

6.2 Seitenbandeneffekt

Es konnte gezeigt werden, dass es nur unter bestimmten Bedingungen zu Umlagerungen innerhalb der Banden eines Absorbanzspektrums kommt. Dieses Phänomen, in dieser Arbeit als Seitenbandeneffekt bezeichnet, tritt auf, wenn alle drei Farbstoffe in einer Probe präsent sind, die beiden roten Chromophore vier Nukleotide voneinander entfernt sind und deren energetische Summe ähnlich zur Energie eines Pyrenzustandes ist.

In Kapitel 6.2.1 werden alle wichtigen Ergebnisse zunächst auf allgemeine Ursachen hin diskutiert, die üblicherweise für An- oder Abstiege in Spektren verantwortlich sind. Da diese aber das Auftreten des Seitenbandeneffektes nicht begründen können, werden im anschließenden

Kapitel 6.2.3 Erklärungsmodelle formuliert, die verschiedene mögliche physikalische Theorien vorstellen.

6.2.1 Grundsätzliche Auffälligkeiten

Unter dem Seitenbandeneffekt wird das Auftreten besonderer Absorbanzunterschiede innerhalb einer Kombination verstanden: Hierbei kommt es bei der Anwesenheit von R_1 und R_2 , insbesondere aber aller drei Farbstoffe zu einer Absenkung des Hauptmaximums verbunden mit einem Anstieg an den hypso- und bathochromen Seiten des Spektrums. Dieser Absorbanzabfall tritt vor allem von R_1NR_2 zu R_1BR_2 auf und könnte zunächst bedeuten, dass die R_1BR_2 -Probe fehlerhaft angesetzt wurde und somit eine geringere Konzentration als R_1NR_2 aufweist.

Da die im DNA-Bereich gemessene Absorbanz beispielsweise in der Kombination I-a Konzentrationsschwankungen von $(3,3 \pm 2,3) \%$ um den Mittelwert aufweist, der Abfall vom R_1NR_2 - zu R_1BR_2 -Absorbanzspektrum jedoch 21 % beträgt (vergleiche Abbildung 5.2, Seite 67), kann es sich hierbei nicht um den Grund handeln. Zudem ist in den Seitenbanden ein Anstieg von R_1NR_2 auf R_1BR_2 um 9 % beziehungsweise 25 % zu beobachten. Dies lässt sich nicht mit Konzentrationsschwankungen erklären, da diese im ganzen Spektrum gleich verteilt auftreten müssten. Ähnliche Verhältnisse ergeben sich in den anderen Kombinationen, die den Seitenbandeneffekt zeigten.

Ein reiner Quenchingeffect zwischen den Farbstoffen würde ebenfalls nur zu einem Abfall führen. Dieses würde jedoch im ganzen Spektrum auftreten und wäre nicht verbunden mit einem Anstieg in den Seitenbanden.

Anzumerken ist, dass es beispielsweise in der Kombination I-a auch schon bei einem Vergleich des R_1NR_2 -Absorbanzspektrums mit dem $(R_1NN + NNR_2)$ -Spektrum zum Seitenbandeneffekt kommt (siehe Abbildung 5.3, Seite 68): Ausgehend von theoretischen Summenspektrum hin zur Zweierkombination ist ein Zuwachs im Nebenmaximum an der höherenergetischen Seite erkennbar (jedoch nicht an der bathochromen Seitenbande) und eine Abnahme im Maximum. Der gleiche Effekt wird, wie eben bereits dargestellt, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Pyren für diese Kombination eindeutig verstärkt und um einen Anstieg auf der bathochromen Seite ergänzt.

Darüber hinaus ist auffällig, dass die Effekte nur in signifikanten Größenordnungen auftreten, wenn der Abstand gering ist. So waren beispielsweise in den Spektren der Kombination II-a die beschriebenen Phänomene zwar vorhanden, aber um ein Vielfaches abgeschwächt, sodass selbst im normierten Differenzspektrum der Peak im positiven Bereich nur noch etwa ein Fünftel des Wertes aus Kombination I-a beträgt. Nach Tabelle 3.5 sollte sich der Abstand der R-Farbstoffe kombinationsunabhängig im Mittel allerdings nicht um mehr als 8 nm unterscheiden: ein optimaler Winkel zieht einen mittleren Abstand von R_1 zu R_2 von 39 nm nach sich, ein optimaler Abstand 34 nm (siehe Tabelle 3.5, Seite 55). Trotzdem sind alle auftretenden Effekte in den Kombinationen mit kleinem Abstand größer. Eine mögliche Ursache könnte die Verlinkung selber sein: Da der B- und R_1 -Farbstoff jeweils intern und somit direkt an die Basenpaare gebunden sind, könnte dies eine Beeinträchtigung der Basenstapelung bedeuten. Eine Bindung durch eine der Furchen hindurch ist sterisch nicht sehr wahrscheinlich, sodass sich die Base eher nach außen klappen wird, um dem Linker und dem Farbstoff Raum zu geben. Dadurch könnte die Base allerdings nicht mehr an der Basenstapelung teilhaben und keine Bindung an den Komplementärstrang aufweisen. Zusätzlich liegt möglicherweise interkaliertes Pyren vor (s. Kapitel 6.2.1). Als Folge könnte die Helixstruktur an dieser Stelle aufgeweitet oder ganz zerstört werden. Läge angesichts dessen eine lineare Form vor, würde dies den Winkel der Farbstoffe zueinander und den Abstand untereinander teilweise stark verändern. Der Winkel zwischen den R-Chromophoren würde kaum noch eine Rolle spielen und in den Kombinationen 1, 3, 5 und 7 der Abstand zwischen ihnen auf $13,6 \text{ \AA}$ ($4 \text{ bp} \rightarrow 3,4 \text{ \AA}$) zwischen R_1 und R_2 verringert werden. An dem 10 bp-Abstand zwischen R_1 und R_2 würde sich in dieser Anordnung jedoch nicht viel ändern: Vorher wurde er zu 39 \AA bestimmt, nun würde er 34 \AA betragen.

Der Seitenbandeneffekt tritt auch in der Kombination III-a in einer signifikanter Größenordnung auf, allerdings nur bedingt durch eine starke Wechselwirkung von R_1 und R_2 . Eine Beeinflussung oder sogar Verstärkung durch Pyren war nicht zu beobachten. Die Erklärung ist hier das typische Verhalten von Homo-Dimeren, wie sie beispielsweise bereits in Kapitel 2.5.1 gezeigt wurden.

Bei dieser Probe handelte es sich zudem um die einzige *Downconversion*-Kombination dieser Gruppe. Ob diese Transferrichtung prinzipiell nicht für eine ausgeprägte Wechselwirkung aller drei Farbstoffe geeignet ist, kann erst mit weiteren Kombinationen untersucht werden. Festzustellen ist jedoch, dass eine energetische Abweichung von über 3 % bei kleinem Abstand zu

keinem Seitenbandeneffekt führt. Dieser ließ sich ebenfalls nicht beobachten, wenn die energetische Abweichung unter 1 % lag, aber die Farbstoffe 8 bp auseinander lagen (Kombinationen II-b und -c).


Die Emissionswerte zeigen mit Ausnahme von Kombination III-b ebenfalls nur in den Kombinationen der Gruppe I besondere Auffälligkeiten und stützen damit die Ergebnisse der Absorbanzmessungen. Da Kombination III jedoch keinen Seitenbandeneffekt zeigte (vgl. Abbildung 5.22, Seite 84), ist das beobachtete *Quenching* wahrscheinlich auf eine Dimer-Wechselwirkung zwischen R_1 und R_2 zurückzuführen, welche keine Auswirkungen auf das Absorbanzspektrum hat.

Der deutlichste Unterschied ergibt sich bei der Betrachtung der Emissionsspektren der R_2 -enthaltenen Proben, die beim NNR_2 -Maximum angeregt wurden. In den Emissionsspektren der Gruppe I ist vor allem von NNR_2 auf R_1BR_2 ein sehr starker Abfall um grob 50 % erkennbar (siehe Abbildung 5.70, Seite 126). Dies könnte allerdings dadurch begründet sein, dass die R_1BR_2 -Proben dieser Kombinationen bereits in einem geringem Maße absorbiert haben als NNR_2 , beziehungsweise R_1NR_2 oder $(R_1NN + NNR_2)$, weshalb folglich auch die Emissionsintensität schwächer sein muss. In Tabelle 6.1 werden daher die prozentualen Unterschiede in den wichtigsten Absorbanz- und Fluoreszenzspektren innerhalb dieser Gruppe I angegeben und miteinander verglichen. Dazu wird das theoretische Summenspektrum ($R_1BN + NBR_2$) als Bezugsspektrum verwendet und die beiden anderen Spektren (R_1NR_2 und R_1BR_2) dazu in Relation gesetzt. Zusätzlich werden beide Emissionsbereiche betrachtet: sowohl der eben vorgestellte R_2 -Wellenlängenbereich, in dem die R_2 -enthaltenen Proben mit der maximalen Absorbanzwellenlänge von NNR_2 angeregt werden als auch der R_1 -Bereich, in dem die R_1 -enthaltenen Proben mit der maximalen Absorbanzwellenlänge von R_1NN angeregt werden.

Die Tabelle zeigt zum einen, dass die prozentualen Differenzen zwischen den R_1NR_2 - und R_1BR_2 -Spektren in den Emissionsmessungen größere Werte annehmen als in den Absorbanzmessungen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es erst zwischen allen drei Farbstoffen zu Wechselwirkungen kommt, die die Intensität am Maximum vermindern.

Zum anderen spiegelt die Tabelle die in Abbildung 5.70 dargestellten Resultate wider und macht so deutlicher, dass sich die Kombinationen in zwei Gruppen unterteilen lassen: Die homochromophoren Kombinationen I-a und I-c und die heterochromophoren Kombinationen I-b und I-d verhalten sich in den Emissionsspektren sehr unterschiedlich.

Tabelle 6.1: Prozentuale Unterschiede zwischen Absorbanz und Fluoreszenz der Kombinationen mit geringem Abstand



Kombination I-a (R ₁ und R ₂ : Cy5.5)				
	Absorbanz[%]		Emission R ₁ [%]	Emission R ₂ [%]
von R ₁ BN + NBR ₂ ...	100	(R ₁ BN + NBR ₂):2	100	100
...auf R ₁ NR ₂	+2	(R ₁ NR ₂):2	-21	-31
...auf R ₁ BR ₂	-17	(R ₁ BR ₂):2	-36	-51

Kombination I-b (R ₁ : Cy5.5, R ₂ : Dy700)				
	Absorbanz[%]		Emission R ₁ [%]	Emission R ₂ [%]
von R ₁ BN + NBR ₂ ...	100	R ₁ BN + NBR ₂	100	100
...auf R ₁ NR ₂	+1	R ₁ NR ₂	-30	-7
...auf R ₁ BR ₂	-21	R ₁ BR ₂	-87	-51

Kombination I-c (R ₁ und R ₂ : Oyster680)				
	Absorbanz[%]		Emission R ₁ [%]	Emission R ₂ [%]
von R ₁ BN + NBR ₂ ...	100	(R ₁ BN + NBR ₂):2	100	100
...auf R ₁ NR ₂	+0,2	(R ₁ NR ₂):2	-21	-31
...auf R ₁ BR ₂	-20	(R ₁ BR ₂):2	-44	-52

Kombination I-d (R ₁ : Dy632, R ₂ : Cy5.5)				
	Absorbanz[%]		Emission R ₁ [%]	Emission R ₂ [%]
von R ₁ BN + NBR ₂ ...	100	R ₁ BN, bzw. NBR ₂	100	100
...auf R ₁ NR ₂	-2	R ₁ NR ₂	-24	-7
...auf R ₁ BR ₂	-18	R ₁ BR ₂	-68	-44

Die homochromophoren Kombinationen zeigen sowohl im R₁- als auch R₂-Bereich bereits von NNR₂ zu R₁NR₂ einen starken Intensitätsabfall, der durch die zusätzliche Präsenz von Pyren leicht verstärkt wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass die größere Wechselwirkung zwischen R₁ und R₂ stattfindet. Ein Energietransfer wie FRET zwischen gleichen Molekülen ist zwar nicht üblich, aber auch nicht unmöglich.^[5] DIETRICH *et al.* konnten zudem zeigen, dass kleine

Abstände zwischen den Farbstoffen meist andere Transferwege als FRET begünstigen (s. Kapitel 2.5.2)^[119] Da die beiden roten Farbstoffe gleich sind, ist eine Dimerbildung aufgrund der ebenfalls annähernd gleichen Energieniveaus zudem begünstigt (vergleiche Kapitel 2.5.1) und daher die wahrscheinlichere Ursache. Das Pyren scheint diese Bildung lediglich zu verstärken (siehe Erklärungsmodell 3).

In der zweiten Gruppe, die die heterochromophoren Paaren umfasst, kommt es im R_1 -Bereich von R_1NN zu R_1NR_2 zwar ebenfalls zu ersten Intensitätsverlusten. Dies kann allerdings nicht durch eine Dimerbildung mit R_2 erklärt werden, da dies ebenfalls in diesem R_2 -Wellenlängenbereich zu merklichen Unterschieden zwischen NNR_2 und R_1NR_2 hätte führen müssen. Wie aber bereits erläutert, kommt es im R_2 -Bereich überhaupt erst zu signifikanten Intensitätsverlusten, wenn alle drei Farbstoffe gleichzeitig vorliegen. Daher könnte in den Kombinationen I-b und I-d ein FRET von R_1 auf R_2 die Ursache für das alleinige Absinken des R_1NR_2 -Emissionsspektrums im R_1 -Wellenlängenbereich sein. Erst bei gleichzeitiger Präsenz aller drei Farbstoffe wird das R_1BR_2 -Emissionsspektrum gegenüber dem von R_1NR_2 stark abgesenkt. Dies spricht wiederum dafür, dass es zwischen allen drei Farbstoffen zu signifikanten Wechselwirkungen kommen muss.

In den Emissionsspektren der Kombinationen mit größerem Abstand (Gruppe II) ist im wichtigen R_2 -Bereich lediglich bei Kombination II-a ein Verhalten der Spektren zueinander erkennbar wie in den Kombinationen zuvor. Da es sich hierbei aber auch um dieselbe homochromophore Farbstoffpaarung wie in Kombination I-a handelt, tritt der beschriebene Effekt der Absenkung von R_1BR_2 gegenüber der restlichen Emissionsspektren auch hier auf, allerdings ebenso abgeschwächt wie bereits in den Absorbanzspektren. Die Kombinationen II-b und II-c zeigen von R_1NN zu R_1NR_2 lediglich im R_1 -Wellenlängenbereich merkliche Abnahmen der Emissionsintensität. Diese werden weder von Pyren beeinflusst noch spiegeln sie sich in einer signifikanten Größenordnung im R_2 -Bereich wieder. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist FRET von R_1 auf R_2 (siehe Abbildungen 11.3 bis 11.5 im Kapitel 11.2.3 des Anhangs). Einzig Kombination II-d zeigt nur in einem Spektrum einen merklichen Intensitätsverlust: Das verminderte R_1BR_2 -Emissionsspektrum im R_1 -Wellenlängenbereich könnte darauf hindeuten, dass es lediglich in der Gegenwart von Pyren zu einem FRET auf R_2 kommt. Die Ursache hierfür konnte nicht geklärt werden.

6.2.2 Korrelation zwischen Absorbanz und Emission

Um abschließend eine Verbindung zwischen den Messmethoden Absorbanz und Fluoreszenz herzustellen, werden in Tabelle 6.2 die wichtigsten Ergebnisse aus Absorbanz- und Emissionsmessungen gegenübergestellt. Hierzu zählen zum einen die maximalen Peakhöhen der R_1BR_2 -Differenzspektren, das heißt die Anstiege der hypso- und bathochromen „Schultern“ (in Abbildung 5.26 dargestellt durch blaue und rote Pfeile). Zum anderen werden verschiedene Werte der Emissionsmessungen wiedergegeben: Sowohl die bereits genannten maximalen Peakhöhen der $(R_1BR_2-R_1NR_2)$ -Differenzspektren als auch erstmalig aufgezeigte Unterschiede vom jeweiligen R-Spektrum zum R_1BR_2 -Spektrum, angegeben als Absinken in Prozent.

Tabelle 6.2: Übersicht der wichtigsten Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionsmessungen

#	$r_{R_1 \leftrightarrow R_2}$	Absorbanzwerte		Emissionswerte			
		blauer Pfeil [%]	roter Pfeil [%]	Anstieg		Unterschied	
				im R_1 -Bereich [%]	im R_2 -Bereich [%]	von R_1 zu R_1BR_2 [%]	von R_2 zu R_1BR_2 [%]
I-a	4 bp / 144°	+ 14	+ 10	+ 25	+ 23	- 44	- 51
I-b	4 bp / 144°	+ 23	+ 10	+ 58	+ 47	- 88	- 51
I-c	4 bp / 144°	+ 10	+ 9	+ 12	+ 12	- 35	- 36
I-d	4 bp / 144°	+ 16	+ 9	+ 43	+ 36	- 70	- 45
II-a	10 bp / 0°	+ 3	+ 1	+ 11	+ 11	- 26	- 25
II-b	8 bp / 72°	+ 5	+ 1	+ 5	+ 10	- 69	- 25
II-c	8 bp / 72°	-1	+ 4	+ 3	+ 12	- 73	- 2
II-d	10 bp / 0°	± 0	± 0	+ 50	+ 9	- 60	± 0
III-a	4 bp / 144°	± 0	4	3	2	-43	-57
III-b	4 bp / 144°	± 0	3	36	31	-47	-47
III-c	4 bp / 144°	1	3	5	4	-55	-13
III-d	4 bp / 144°	-1	-1	17	0	-77	-16

Es fällt auf, dass besonders große Effekte in beiden Messmethoden nur dann auftreten, wenn die Farbstoffe nah beieinander liegen und energetisch ähnlich sind. Dies legt nahe, dass eine Kor-

relation zwischen Absorbanz- und Emissionswerten besteht. Um dieses zu überprüfen, werden zwei Werte gegeneinander aufgetragen (s. Abbildung 6.1): zum einen der Wert des Anstieges der hypsochromen Schulter, die bei der Bildung der Differenzspektren der Absorbanzen entstanden ist (Höhe des blauen Pfeils), und zum anderen der Abfall von $I_{\text{Fl,max}}^{R_1NR_2}(\lambda_{R_2(\text{Abs,max})})$ auf $I_{\text{Fl,max}}^{R_1BR_2}(\lambda_{R_2(\text{Abs,max})})$. Durch die Verwendung dieser Werte wird die Wechselwirkung der beiden roten Farbstoffe untereinander als Basis genommen und nur die Effektverstärkung durch Pyren untersucht. Der Zusammenhang ist klar erkennbar: Je größer der Anstieg in der Absorbanz, desto größer ist der Abfall in der Emission.

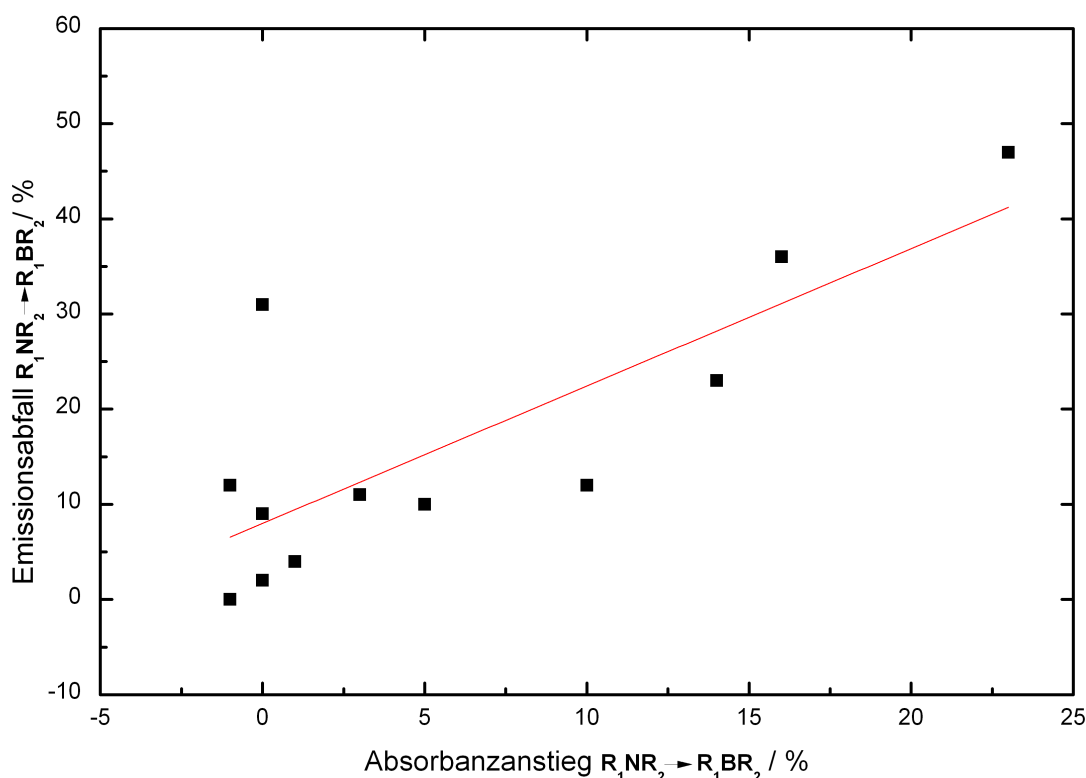


Abbildung 6.1: Korrelation zwischen dem Wert des Anstieges der hypsochromen Schulter, die bei der Bildung der Differenzspektren der Absorbanzen entstanden ist, und dem Unterschied zwischen den Emissionsspektren von R_1NR_2 und R_1BR_2 im Maximum von R_2 .

Hierbei ist es nicht entscheidend, ob die Chromophore auf den geplanten FRET ausgelegt waren, solange die Summe der Absorbanzmaxima von R_1 und R_2 gleich oder höher des Absorbanzmaximums von B ist.

6.2.3 Mögliche Erklärungsmodelle

Exzitonische Wechselwirkungen

Der Seitenbandeneffekt wurde in Kapitel 5.2.1 definiert als das Auftreten von Intensitätszunahmen zu beiden Seiten eines Hauptmaximums (homochromophore Kombinationen) beziehungsweise zu mindestens einer Seite des jeweiligen Hauptmaximums (heterochromophore Kombinationen). Aus den drei wichtigsten, unnormierten Absorbanzspektren wurden Differenzspektren gebildet, bei denen die Wechselwirkungen zwischen R_1 und R_2 als Bezugsgröße gewählt wurde ($(R_1NR_2 - R_1NR_2)$, $(R_1BR_2 - R_1NR_2)$ und $([R_1BN + NBR_2] - R_1NR_2)$). Bei vorhandenem Seitenbandeneffekt erschienen hier die Intensitätszunahmen als Peak(s) im positiven Bereich, in Kombination I-a und I-d sogar in symmetrischer Ausprägung (siehe Abbildung 5.20, Seite 82).

Unterstützend dazu belegen die Kombinationen der Gruppe III, dass nicht alleine die räumliche Nähe der beteiligten Farbstoffe zum Auftreten signifikanter Spektrenunterschiede führt, sondern die Farbstoffe zusätzlich über energetisch gleichartige Zustände verfügen müssen.

Dieses spektroskopische Auftreten des Seitenbandeneffektes erinnert an die Bildung exzitonischer Banden in Zweifarbstoffsystemen, wie sie bereits in Kapitel 2.5.1 auch von SEIBT (Seite 22) oder BOLLMANN (Seite 23) vorgestellt wurden. Da die in dieser Arbeit präsentierten Effekte im Zweifarbstoffsystem R_1NR_2 jedoch kaum auftraten, sondern erst im Dreiersystem aus B, R_1 und R_2 , liegt die Vermutung nahe, dass es zu exzitonischen Wechselwirkungen zwischen allen drei Farbstoffen kommt.* Dabei müsste es zu einer Kombination der doppelt angeregten roten Farbstoffe kommen, die daraufhin einen exzitonischen Zustand mit dem einfach angeregten Pyrenzustand eingehen. Diese Wechselwirkung lässt sich mit Abbildung 6.2 verdeutlichen. Hier werden die nötigen Niveaus gezeigt, die an der Bildung eines "Trimers" beteiligt wären.

In dieser Abbildung wird deutlich, dass für eine solche Wechselwirkung die Aufspaltung der Niveaus auch eine Veränderung im blauen Wellenlängenbereich nach sich ziehen müsste. Es konnte dort gezeigt werden, dass die Anwesenheit eines roten Farbstoffes zu einer leichten bathochromen Verschiebung der Absorbanz von Pyren führt. Ein Quenchingeffekt von $(R_1NN + NNR_2)$ zu R_1NR_2 in der Kombination I-a konnte ebenfalls beobachtet werden, auch wenn das $\Delta D_{R_1,R_2}$ -Spektrum der Delta-Methode stark negativ verläuft. Da diese Methode in diesem Bereich aber für keinen Informationsgewinn gesorgt hat, wird nicht weiter auf sie eingegangen.

* Räumliche Nähe der Farbstoffe jeweils vorausgesetzt, hier 4 bp zwischen R_1 und R_2 und je 2 bp von B zu R_1 und R_2

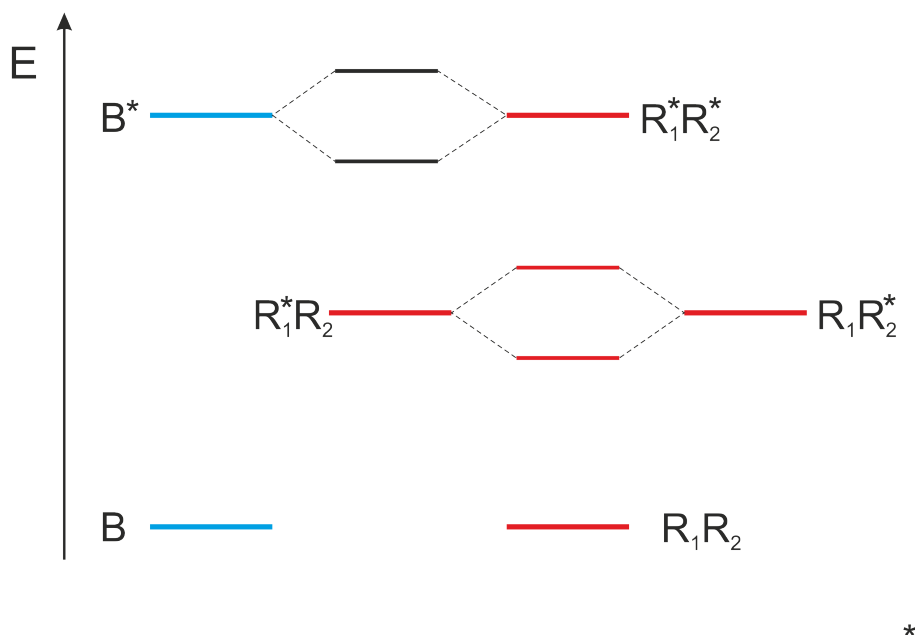


Abbildung 6.2: Nötige Niveaubeteiligung zur Bildung eines exzitonisch angeregten Trimers.

Was allerdings nicht beobachtet werden konnte, sind spezifische Veränderungen des Absorptionsverhaltens, sobald alle drei Farbstoffe gleichzeitig präsent waren. In keiner der Kombinationen gab es Hinweise auf einen Seitenbanden- oder anderen spezifischen Effekt, was jedoch zwei Umständen geschuldet sein kann. Zum einen steigt die Gesamtabsorbanz durch die DNA und den verwendeten Puffer im Wellenlängenbereich des Pyrens stark an. Die Pufferabsorbanz und die Einflüsse der DNA-Absorbanz werden zwar so gut wie möglich herausgerechnet, doch da das Absorptionsvermögen von Pyren demgegenüber sehr schwach ist (um etwa 96 % schwächer als das DNA-Absorbanzmaximum), kann es zu Überlagerungen der Spektren kommen.

Darüber hinaus wurde Pyren meist 20 bis 25 % im Überschuss eingesetzt (s. Tabelle 3.2, Seite 46). Dies bedeutet, dass der ungebundene Anteil der Pyren-Stränge zwar zur Gesamtabsorbanz beiträgt, aber nicht zur Wechselwirkung mit den roten Farbstoffen. Zudem liegt ein Teil des Pyrens möglicherweise interkaliert vor (siehe Seite 133). Dieser Anteil würde zwar ebenfalls zur Gesamtabsorbanz beitragen, aber nicht an der Wechselwirkung aller drei Farbstoffe teilhaben.

Der Anteil des Pyrens, der also insgesamt mit R_1 und R_2 interagieren kann, ist dementsprechend kleiner und eine mögliche Veränderung in den Absorbanzspektren durch die oben genannten Umstände weniger eindeutig erkennbar.

Eine quantenchemische Betrachtung zeigt allerdings, dass eine exzitonische Wechselwirkung zwischen einem einfach angeregten Pyren und einem doppelt angeregten R_1NR_2 -Dimer nach den SLATER-CONDON-Regeln nicht wahrscheinlich ist: Bei einer direkten Kopplung zwischen den hier betrachteten elektronischen Zuständen unterscheiden sich die SLATER-Determinanten in mehr als zwei Spinorbitalen. HAMILTONIAN-Matrixelemente zwischen solchen SLATER-Determinanten ergeben allerdings den Wert Null. Um dieses zu umgehen, wäre daher eine indirekte Kopplungen über einen Zwischenzustand vorstellbar, der mathematisch den Zustand des einfach angeregten Dimers R_1NR_2 mit dem Zustand des zweifach angeregten Trimers verknüpft.

Vibronische Kopplung

Die Anstiege in den Seitenbanden und der Abfall des Zentralpeaks können auch ein Anzeichen für vibronische Veränderungen innerhalb der roten Farbstoffe darstellen: Hierbei würde eine Umverteilung der Energie auf andere Übergänge zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand erfolgen, da sich beispielsweise die Potenzialkurven anders zueinander verschieben. Nach dem FRANK-CONDON-Prinzip würden daraufhin neue Übergänge zu anderen Schwingungsniveaus des ersten angeregten Zustandes stattfinden. Dafür spricht, dass die Anstiege meist nicht neu entstehen, sondern dass bereits vorhandene Banden verstärkt werden. Allerdings könnte dies auch durch ein zufälliges Überlagern einer exzitonischen Bande mit einer Schwingungsbande entstehen, so wie es auch bei SEIBT *et al.* auftritt.^[75]

Aus den theoretisch berechneten Spektren von GOEZ und NEUGEBAUER wurde deutlich, dass sich die Farbstoffe gegenseitig in ihrer Schwingungsstruktur beeinflussen. Pyren nimmt zudem geometrieabhängig eine signifikante Rolle in der Ausprägung der Absorbanzspektren der roten Farbstoffe ein. Die so erreichten Ergebnisse sind allerdings bisher nur Indizien und keine Beweise: Keines der Spektren kann qualitativ oder quantitativ die praktisch erhaltenen Ergebnisse in ihrer Gesamtheit nachstellen. Oftmals kommt es sogar zu den größeren Veränderungen, sobald lediglich die beiden roten Farbstoffe zusammentreffen (ähnlich zu SEIBT *et al.*) oder die errechneten Verschiebungen treten in die entgegengesetzte Richtung auf. Allerdings sind die verwendeten Berechnungsmethoden bisher recht trivialer Art gewesen und berücksichtigten noch nicht alle realen Bedingungen. So muss beispielsweise der Orientierungswinkel der Übergangsdipolmomente der beiden roten Farbstoffe von 0° auf andere Winkel gebracht werden.

Das Modell der vibronischen Wechselwirkungen allein kann zudem auch nicht erklären, warum die praktisch entstehenden Effekte erst in Anwesenheit aller drei Farbstoffe auftreten und nicht bereits in den jeweiligen Zweierkombinationen. Zwischen R_1 und B und R_2 und B kommt es folglich nur zu umgebungsspezifischen Polarisations- oder Quenchingeffekten, obwohl sie näher beieinander liegen als die R-Farbstoffe zueinander.

Beeinflussung des Dimers durch Pyren

Letztendlich ist eine Kombination der verwendeten Erklärungsmodelle möglich: Die Bildung eines Dimers R_1NR_2 und dessen Beeinflussung durch Pyren, wobei dieses die geometrische Struktur des Dimers so verändert, dass es zum Seitenbandeneffekt kommt. In den theoretisch berechneten Spektren in Kapitel 5.2.2 (ab Seite 5.2.2) war bereits erkennbar, dass es sowohl zu einer exzitonischen Wechselwirkung zwischen R_1 und R_2 kommen kann als auch zu der bereits genannten Beeinflussung durch Pyren.

Für dieses Modell spricht, dass es bei den Absorbanzmessungen bereits beim R_1NR_2 -Spektrum im Vergleich zum hypothetischen Spektrum ($R_1BN + NBR_2$) zum Auftreten des Seitenbandeneffektes kam, der bei gleichzeitiger Anwesenheit aller drei Farbstoffe noch verstärkt wurde. In den Emissionsspektren wurde deutlich, dass es in den homochromophoren Kombinationen der Gruppe I bereits zu einem starken Absinken der Intensität kommt, wenn nur die beiden roten Farbstoffe vorhanden sind. Innerhalb der heterochromophoren Kombinationen I-b und I-d kam es dagegen erst bei der Zusammentreffen aller drei Farbstoffe zu einer starken Intensitätsabnahme. Gerade hier scheint Pyren eine wichtige Vermittlerrolle einzunehmen, die in den homochromophoren Kombinationen weniger nötig scheint.

Allerdings scheint Pyren auf die roten Farbstoffe eher „passiv“ einzuwirken: Zu beobachten ist bei Betrachtung der vier wichtigsten Absorbanzspektren im blauen Bereich (NBN , ($R_1BN + NBR_2 - NBN$), ($NBN + R_1NR_2 - NNN$) und R_1BR_2), dass sich die Spektren von Pyren nur verändern, wenn ein roter Farbstoff dazukommt und diese Veränderung auch behält, wenn der zweite rote Farbstoff dazukommt. Eine mögliche Dimerbildung von R_1 und R_2 und die Dreierkombination an sich üben anscheinend keinen Einfluss auf das Pyren selbst aus. Lediglich in den Emissionsspektren des Pyrens lässt sich ein *Quenching* beobachten, welches jedoch unabhängig von den Abständen der Farbstoffe untereinander stattfindet. Es bleibt deshalb bei diesem Erklärungsmodell die Frage offen, mit welchem Mechanismus Pyren das Dimer beeinflusst. Die naheliegendste Erklärung wäre ein Zustand des Pyrens, der mit den exzitonisch aufgespaltenen

Zuständen des roten Dimers wechselwirken könnte. Allerdings besitzt Pyren in diesem Wellenlängenbereich keine in Frage kommenden Zustände und, wie durch GOEZ und NEUGEBAUER geprüft, auch keine sogenannten *dark states**. Das S_1 -Niveau des Pyrens ist zwar optisch verboten, liegt aber mit etwa 400 bis 450 nm^[113,114,137] jedoch energetisch zu weit von den Niveaus der roten Farbstoffe entfernt.

Zu klären bleibt zudem, warum die Pfeilwerte innerhalb der heterochromophoren Kombinationen mit geringem Abstand höher waren als bei den homochromophoren (s. Abbildung 5.26). Dies ist nicht zu erwarten gewesen, wenn im homochromophoren Fall von einer gleichmäßigen Beteiligung der beiden Farbstoffe auf die Seiten des Spektrums ausgegangen wird. Hier hätten sich die Effekte in den homochromophoren Kombinationen verstärken müssen und zu höheren Werten führen müssen. Möglicherweise heben sich die Effekte hierbei allerdings auf, während sie sich in den heterochromophoren Kombinationen ergänzen.

Ein weiterer Nachteil dieses Erklärungsmodells ist, dass die homochromophoren Kombinationen der Gruppen II und III keine Beeinflussung innerhalb der relevanten Spektren zeigten. In Gruppe II sind R_1 und R_2 möglicherweise zu weit voneinander entfernt um exzitonische Wechselwirkungen miteinander eingehen zu können. Die günstigere, nähere räumliche Anordnung der Farbstoffe in Gruppe III hätte aufgrund der gleichen Bedingungen wie in Gruppe I daher einen Seitenbandeneffekt und ein starkes Fluoreszenz-*Quenching* im R_2 -Bereich zeigen müssen. Das simultane Ausbleiben beider Effekte lässt darauf schließen, dass die energetische Lage der Pyren-Zustände doch einen entscheidenden Einfluss besitzen muss.

* Zustände, in die nicht absorbiert und/oder von denen nicht emittiert werden kann, z. B. durch optisch verbotene Zustände

7 Zusammenfassung und Ausblick

Die Existenz eines effizienten gegabelten Energietransfers, bei dem entweder ein einzelner Donor seine komplette Energie gleichzeitig auf zwei Akzeptoren überträgt (Prinzip der *Downconversion*) oder zwei Donoren ihre Energie gesammelt auf einen einzelnen Akzeptor übertragen (Prinzip der *Upconversion*), wäre sowohl für grundlegende Fragestellungen als auch für praktische Anwendungen sehr interessant. Grundvoraussetzung für einen solchen Transfer wäre, dass die Energie, die von einem Molekül aufgenommen oder abgegeben wird, in der Summe der Energien entspricht, die von zwei anderen Molekülen gleichzeitig aufgenommen beziehungsweise abgegeben wird (siehe Gleichungen 1.3 und 1.4, Seite 3). Daraus folgt, dass sich die jeweilig summierten Emissions- und Absorbanzenenergien decken müssen, aber eine spektrale Überlappung zwischen Donor(en) und Akzeptor(en) nicht zwangsläufig vorliegen müsste.

Das Ziel dieser Arbeit war es, nach Indizien für einen solchen Transfer zu suchen und mögliche die Bedingungen hierfür zu analysieren. Dazu wurde Pyren, das im blauen Bereich absorbiert und fluoresziert*, mit Farbstoffpaaren kombiniert, die rotverschoben dazu absorbieren und fluoreszieren†. Alle Farbstoffe wurden an einzelne DNA-Stränge gebunden, was verschiedene Kombinationsmöglichkeiten und eine flexible Einstellung der Abstände untereinander erlaubte. Zur Analyse des spektralen Verhaltens des Systems wurden Absorbanz- und Fluoreszenzspektren aufgenommen und ausgewertet. Die untersuchten Dreifarbstoffsysteme beinhalteten neben Pyren homo- und heterochromophore Paare von roten Farbstoffen. Der Abstand zwischen R₁ und R₂ betrug entweder vier Basenpaare (Gruppe I und III) oder acht bis zehn Basenpaare (Gruppe II), wobei sich Pyren stets mittig dazwischen befand. Darüber hinaus passten die roten Farbstoffe im Sinne von *Upconversion* energetisch im Bereich von $\pm 4\%$ und in Sinne von *Downconversion* energetisch im Bereich von $\pm 1\%$ zu Pyren (Gruppe I und II) oder unterschieden sich stark davon (mehr als 9 %, in Sinne der *Upconversion* bzw. mehr als 3 %, in Sinne der *Downconversion* Gruppe III).

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei gleichzeitiger Anwesenheit aller drei Farbstoffe unter bestimmten Bedingungen zu einem sogenannten Seitenbandeneffekt kommt. Hierbei handelt es sich um eine Intensitätsumverteilung in den Absorbanzspektren, wie sie beispielsweise bei exzitonischen Wechselwirkungen in Zweifarbstoffsystemen auftreten: Das Hauptmaximum

* Bezeichnung: B

† Bezeichnung: R₁ und R₂

wurde abgeschwächt, die Seitenbanden verstärkt (siehe Definition auf Seite 70). Dieser Effekt trat nur auf, wenn der Abstand zwischen R_1 und R_2 klein war (4 bp) und gleichzeitig ihre summierte Energie nach Gleichungen 1.4 und 1.3 um weniger als 5 % von B abwich (Gruppe I, Spektren siehe Abbildung 5.20, Seite 82 und Abbildung 5.23, Seite 86).

Wenn die Energie zwischen den Farbstoffen übereinstimmte, aber der Abstand von R_1 und R_2 zueinander mehr als acht Basenpaare betrug (Gruppe II), dann trat der Seitenbandeneffekt sehr stark abgeschwächt bis gar nicht auf (Spektren 5.21 und 5.24, Seite 83 und 87). Der Seitenbandeneffekt verschwand ebenfalls, wenn die Farbstoffe zwar nah beieinander lagen, aber sich die energetische Summe von R_1 und R_2 zu stark von B unterschied (Gruppe III).

Die Emissionsmessungen unterstützen die Beobachtungen aus den Absorbanzspektren: Nur in Gruppe I (kleiner Abstand und passende Energie) lag in dem Wellenlängenbereich, in dem nur R_2 angeregt wurde, ein im Verhältnis zu R_1NR_2 sehr stark abgeschwächtes R_1BR_2 -Emissionsspektrum vor.

Die Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionsmessungen deuten auf exzitonische Wechselwirkungen zwischen allen drei Farbstoffen B, R_1 und R_2 hin (Erklärungsmodell 1, Seite 143). Da die elektronischen Kopplungen für Exzitonenbildung und Energietransfer identischer Natur sind und es nur von der energetischen Ähnlichkeit abhängt, welches von beiden dominiert*, sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ein erstes Indiz dafür, dass ein gegabelter Energietransfer möglich ist.

Das Auftreten des Seitenbandeneffektes lässt sich nicht als triviale Betrachtung einer exzitonischen Wechselwirkung aller drei Farbstoffe auffassen. Hierzu müsste das Gesamtsystem der exzitonischen Wechselwirkungen zwischen B, R_1 und R_2 als einfach angeregtes Trimer $B^*R_1R_2$ aufgefasst werden, dass in Wechselwirkung mit dem zweifach angeregten Trimer $BR_1^*R_2^*$ steht. Aus quantenchemischer Betrachtung unter Berücksichtigung der SLATER-CONDON-Faktoren sollte ein solches System mit derzeitigen Modellvorstellungen jedoch nicht möglich sein (siehe Seite 145). Zusätzlich hätte vor allem in den Absorptionsspektren des blauen Farbstoffes ein signifikanter Unterschied von den Spektren der jeweiligen Zweierkombinationen zum R_1BR_2 -Spektrum auftreten müssen (siehe Abbildung 6.2, Seite 6.2), so wie auch Veränderungen im Bereich der roten Farbstoffe erkennbar waren. Durch die mögliche Interkalation und den Kon-

* Energie gleich: Exzitonenbildung dominiert; Energie ähnlich: Energietransfer dominiert

zentrationenüberschuss des Pyrens könnte die Detektion einer Änderung jedoch stark erschwert gewesen sein.

Eine andere Erklärung des Seitenbandeneffektes wäre eine Kopplung zu einer Schwingungsbande des jeweiligen Farbstoffes (Erklärungsmodell 2, Seite 145). Dafür spricht, dass in den Messergebnissen die Verstärkung der Seitenbanden oftmals mit einer bereits vorhandenen Vibrationsbande zusammenfällt. Zusätzlich konnte durch theoretisch berechnete Spektren von GOEZ und NEUGEBAUER gezeigt werden, dass Pyren grundsätzlich einen Einfluss auf die Schwingungsstruktur der roten Farbstoffe hat und die Absorbanz geometrieabhängig verändern kann (Kapitel 5.2.2, Seite 96). Allerdings sollte sich dieser Effekt im Sinne der FRANCK-CONDON-Regeln (siehe Kapitel 2.3.2) nur auf die Haupt- und die vibronischen Nebenbande beziehen. Erkennbar ist in den Ergebnissen jedoch stets ein beidseitiger Effekt.

Da es zwischen R_1 und R_2 vor allem bei den homochromophoren Paaren mit geringem Abstand zu exzitonischen Wechselwirkungen kommt, wäre eine weitere Möglichkeit zur Begründung des Seitenbandeneffektes, dass Pyren lediglich als „Brücke“ zwischen beiden roten Farbstoffen die bereits vorhandene Wechselwirkung verstärkt (Erklärungsmodell 3, Seite 146). In diesem Fall sollte der Seitenbandeneffekt allerdings in heterochromophoren Paarungen schwächer auftreten, da hier die exzitonische Wechselwirkung zwischen R_1 und R_2 bereits viel schwächer ist. Das Gegenteil wurde jedoch beobachtet. Zudem ist kein Grund bekannt, warum bei einer bloßen Vermittlerrolle des Pyrens der Seitenbandeneffekt nicht auch in den Spektren der Gruppe III (kleiner Abstand, energetisch abweichend) auftreten sollte.

Sowohl die räumliche Nähe als auch die energetische Ähnlichkeit der beiden roten Farbstoffe zu Pyren ist entscheidend für das Auftreten des Seitenbandeneffektes. Dies spricht für starke Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffen und das Erklärungsmodell 1. Allerdings fehlt noch eine theoretische Vorstellung, wie diese Wechselwirkungen im Detail aussehen könnten. Hierzu müssen in Zukunft die zu Grunde liegenden quantenchemischen Modelle weiter verfeinert und realistischen Bedingungen angepasst werden. In der Praxis sind die bereits erhaltenen Ergebnisse der Absorptions- und Emissionsmessungen dennoch starke Hinweise auf gegabelte Wechselwirkungen. Somit konnte mit dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass ein gegabelter Energietransfer tatsächlich möglich sein könnte. Eine potenzielle Anwendung liegt beispielsweise in der Solarenergiegewinnung: Durch geschickt gewählte Dreifarbstoffsysteme könnte der Teil

der Photonenenergie des Sonnenlichts, die durch die Silizium-Bandlücke in Solarzellen verloren geht, besser genutzt werden und zu einer der Wirkungsgraderhöhung beitragen.

8 Literatur

- [1] Stryer, L.; Haugland, R. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1967**, 58, 719–726.
- [2] Steinberg, I. Z. *Annual Review of Biochemistry* **1971**, 40, 83–114.
- [3] Brown, R. J. et al. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, 12, 814–821.
- [4] Eidne, K. A.; Kroeger, K. M.; Hanyaloglu, A. C. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **2002**, 13, 415–421.
- [5] Kasha, M. *Radiation Research* **1963**, 20, 55.
- [6] Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836–850.
- [7] Tsien, R. Y. *Annual Review of Biochemistry* **1998**, 67, 509–544.
- [8] Jonsson, T.; Waldburger, C. D.; Sauer, R. T. *Biochemistry* **1996**, 35, 4795–4802.
- [9] Marras, S. A. E.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Nucleic Acids Research* **2002**, 30, e122.
- [10] Parkhurst, K. M.; Parkhurst, L. J. *Biochemistry* **1995**, 34, 285–292.
- [11] Giestas, L.; Ferreira, G. N. M.; Baptista, P. V.; Lima, J. C. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, 134, 146–157.
- [12] Haustein, E.; Jahnz, M.; Schwille, P. *ChemPhysChem* **2003**, 4, 745–748.
- [13] Bailey, S. T. et al. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2007**, 91, 67–75.
- [14] Hohng, S.; Joo, C.; Ha, T. *Biophys. J.* **2004**, 87, 1328–1337.
- [15] Watrob, H. M.; Pan, C.-P.; Barkley, M. D. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 7336–7343.
- [16] Martí, A. A. et al. *Tetrahedron* **2007**, 63, 3591–3600.
- [17] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, 2004–2021.

- [18] IBA, Labeling chemistries und Custom oligonucleotides labeled via Click-Chemistry. 7.6.2013; http://www.iba-lifesciences.com/Services_custom_oligos_custom_DNa_Fluorescent_label_Chemistry.html.
- [19] Newton, I. *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*; 1687.
- [20] Planck, M. *The origin and development of the quantum theory*; The Clarendon press: Oxford, 1922.
- [21] Broglie, L. d. *Recherches sur la théorie des quanta*. Ph.D. thesis, 1924.
- [22] Schrödinger, E. *Annalen der Physik* **1926**, 384, 361–376.
- [23] Schrödinger, E. *Annalen der Physik* **1926**, 384, 489–527.
- [24] Schrödinger, E. *Annalen der Physik* **1926**, 385, 437–490.
- [25] Schrödinger, E. *Annalen der Physik* **1926**, 386, 109–139.
- [26] Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C. *Principles of molecular photochemistry: An introduction*; Univ. Science Books: Sausalito and Calif, 2009.
- [27] Hamilton, W. R. In *Philosophical transactions of the Royal Society of London*; Royal Society,, Ed.; W. Bowyer and J. Nichols for Lockyer Davis, printer to the Royal Society: London, 1834; Vol. II; pp 247–308.
- [28] Hamilton, W. R. In *Philosophical transactions of the Royal Society of London*; Royal Society,, Ed.; W. Bowyer and J. Nichols for Lockyer Davis, printer to the Royal Society: London, 1835; Vol. I; pp 95–144.
- [29] Fermi, E. *Nuclear physics*, rev. ed. ed.; Univ. of Chicago Press: Chicago, 1950.
- [30] Dirac, P. A. M. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1927**, 114, 243–265.
- [31] Wentzel, G. Z. *Physik (Zeitschrift für Physik)* **1927**, 43, 524–530.
- [32] Blankenship, R. E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*; Blackwell Science: Oxford and Malden and MA, 2002.

- [33] Haken, H.; Wolf, H. C.; Haken-Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen ; mit 43 Tabellen*, 2nd ed.; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, 1994.
- [34] Atkins, P.; Friedman, R. *Molecular quantum mechanics*, 4th ed.; Oxford Univ. Press: Oxford, 2008.
- [35] Atkins, P. W. *Quanta: A handbook of concepts*, 2nd ed.; Univ. Press: Oxford, 1991.
- [36] *The New Encyclopædia Britannica: In 32 volumes*, 15th ed.; Encyclopaedia Britannica Inc: Chicago, 2005.
- [37] Lagassé, P. *The Columbia encyclopedia*, 6th ed.; Columbia University Press and Sold and distributed by Gale Group: New York and [Detroit], 2000.
- [38] Atkins, P. W.; Paula, J. d. *Physikalische Chemie*, 4th ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2012.
- [39] Morse, P. *Physical Review* **1929**, 34, 57–64.
- [40] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer-Verlag: s.l, 2006.
- [41] Franck, J.; Dymond, E. G. *Transactions of the Faraday Society* **1926**, 21, 536.
- [42] Condon, E. *Physical Review* **1926**, 28, 1182–1201.
- [43] Condon, E. *Physical Review* **1928**, 32, 858–872.
- [44] Jabłoński, A. Z. *Physik (Zeitschrift für Physik)* **1935**, 94, 38–46.
- [45] Wedler, G. *Lehrbuch der physikalischen Chemie*, 3rd ed.; VCH: Weinheim, 1987.
- [46] Kasha, M. *Discuss. Faraday Soc* **1950**, 9, 14–19.
- [47] Stokes, G. G. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **1852**, 463–562.
- [48] Stokes, G. G. In *Mathematical and physical papers*; Larmor, J., Ed.; Cambridge University Press Warehouse (Clay and Sons): Cambridge, 1904; Vol. 4; pp 1–17.
- [49] Stokes, G. G. In *Mathematical and physical papers*; Larmor, J., Ed.; Cambridge University Press Warehouse (Clay and Sons): Cambridge, 1904; Vol. 4; pp 18–21.

- [50] Stokes, G. G. In *Mathematical and physical papers*; Larmor, J., Ed.; Cambridge University Press Warehouse (Clay and Sons): Cambridge, 1904; Vol. 4; pp 22–29.
- [51] Walla, P. J. *Modern biophysical chemistry: Detection and analysis of biomolecules*; Wiley-VCH-Verl.: Weinheim, 2009.
- [52] Marras, S. E. *Molecular Biotechnology* **2008**, 38, 247–255.
- [53] Kaplanová, M.; Čermák, K. *Journal of Photochemistry* **1981**, 15, 313–319.
- [54] Grzywacz, J. *Journal of Luminescence* **1971**, 4, 244–248.
- [55] Velapoldi, R. A. *A fluorescence standard reference material, quinine sulfate dihydrate*; Standard Reference Materials; 1980; Vol. 64.
- [56] Förster, T. *Fluoreszenz organischer Verbindungen*; Vandenhoeck & Ruprecht: Göttingen, 1982.
- [57] Birks, J. B. *Photophysics of aromatic molecules*; Wiley monographs in chemical physics; Wiley-Interscience: London, 1970.
- [58] van Amerongen, H.; Valkunas, L.; van Grondelle, R. *Photosynthetic excitons*; World Scientific: Singapore and River Edge and NJ, 2000.
- [59] Mulliken, R. S. *Chemical Reviews* **1931**, 9, 347–388.
- [60] Mulliken, R. S. *Journal of the American Chemical Society* **1932**, 54, 4111–12.
- [61] Mulliken, R. S. *The Journal of Chemical Physics* **1935**, 3, 375.
- [62] Mulliken, R. S. Spectroscopy, molecular orbitals, and chemical bonding: Nobel Lecture, December 12, 1966.
- [63] Hund, F. *Physikalische Zeitschrift* **1927**, 28, 779–84.
- [64] Hund, F. *Zeitschrift fuer Physik* **1927**, 42, 93–120.
- [65] Hund, F. *Zeitschrift fuer Physik* **1927**, 43, 805–26.
- [66] Lewis, G. N.; Pitzer, K. S. *Valence and the structure of atoms and molecules*; Dover Books on Chemistry and Physical Chemistry; Dover Publications: New York, 1966.
- [67] Stevens, B.; Hutton, E. *Nature* **1960**, 186, 1045–1046.

- [68] Förster, T. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1969**, 8, 333–343.
- [69] Shigemitsu, Y.; Katsuhara, Y.; Odaira, Y. *Tetrahedron Letters* **1971**, 12, 2887–2890.
- [70] Kasha, M. *Reviews of Modern Physics* **1959**, 31, 162–169.
- [71] Kasha, M. Classification of excitons. Physical processes in radiation biology. 1964; pp 17–19, discussion 20–2.
- [72] McRae, E. G.; Kasha, M. The molecular exciton model. Physical processes in radiation biology. 1964; pp 23–42.
- [73] Hoijtink, G. J. *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1960**, 64, 156–157.
- [74] Kasha, M.; Rawls, H. R.; Ashraf El-Bayoumi, M. *Pure and Applied Chemistry* **1965**, 11, 371–392.
- [75] Seibt, J.; Dehm, V.; Würthner, F.; Engel, V. *The Journal of Chemical Physics* **2007**, 126, 164308.
- [76] Bollmann, S.; Lollmann, M.; Sauer, M.; Doose, S. *Phys. Chem. Chem. Phys* **2011**, 13, 12874–12882.
- [77] Förster, T. *Annalen der Physik* **1948**, 437, 55–75.
- [78] Liu, K.-L.; Lee, S.-J.; Chen, I.-C.; Hsu, C.-P.; Chen, C.-H.; Luh, T.-Y. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, 117, 64–70.
- [79] Bethe, H. *Handbuch der Physik: Quantenmechanik der Ein- und Zweielektronenprobleme*; Springer Berlin: Berlin, 1933; Vol. 1.
- [80] Förster, T. *Zeitschrift fuer Elektrochemie und Angewandte Physikalische Chemie* **1949**, 53, 93–9.
- [81] Perrin, J.-B. Conseil de Chimie Solvay, Paris, 1926; pp 322–380.
- [82] Perrin, J.-B. *Comptes Rendus* **1927**, 184, 1097–1100.
- [83] Perrin, F. *Annalen der Physik* **1932**, 17, 283–314.
- [84] Clegg, R. M. In *Fluorescence imaging spectroscopy and microscopy*; Wang, X.-f., Ed.; A Wiley Interscience publication; Wiley: New York, 1996; Vol. 137; pp 179–252.

- [85] Förster, T. *Disc. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7–17.
- [86] Dale, R.; Eisinger, J.; Blumberg, W. *Biophysical Journal* **1979**, 26, 161–193.
- [87] Ranjit, S.; Gurunathan, K.; Levitus, M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, 113, 7861–7866.
- [88] Berger, W.; Prinz, H.; Striessnig, J.; Kang, H.-C.; Haugland, R.; Glossmann, H. *Biochemistry* **1994**, 33, 11875–11883.
- [89] Clegg, R. M.; Murchie, A. I.; Lilley, D. M. *Biophysical Journal* **1994**, 66, 99–109.
- [90] Juskowiak, B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 399, 3157–3176.
- [91] Kienzler, A.; Flehr, R.; Kramer, R. A.; Gehne, S.; Kumke, M. U.; Bannwarth, W. *Bioconjugate Chem* **2011**, 22, 1852–1863.
- [92] Altevogt née Kienzler, A.; Flehr, R.; Gehne, S.; Kumke, M. U.; Bannwarth, W. *Helvetica Chimica Acta* **2012**, 95, 543–555.
- [93] Roy, R.; Hohng, S.; Ha, T. *Nature Methods* **2008**, 5, 507–516.
- [94] Lee, N. K. et al. *Biophysical Journal* **2007/1/1/**, 92, 303–312.
- [95] Galperin, E.; Verkhusha, V. V.; Sorkin, A. *Nature Methods* **2004**, 1, 209–217.
- [96] Göppert-Mayer, M. *Annalen der Physik* **1931**, 401, 273–294.
- [97] Kaiser, W.; Garrett, C. *Physical Review Letters* **1961**, 7, 229–231.
- [98] Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemie*, 5th ed.; Spektrum-Lehrbuch; Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg, 2003.
- [99] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [100] nobelprize.org, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962. 11.11.2008; http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/.
- [101] Dickerson, R.; Drew, H.; Conner, B.; Wing, R.; Fratini, A.; Kopka, M. *Science* **1982**, 216, 475–485.
- [102] Yakovchuk, P.; Protozanova, E.; Frank-Kamenetskii, M. D. *Nucleic acids research* **2006**, 34, 564–574.

- [103] Tyagi, S.; Kramer, F. *nature biotechnology* **1996**, *14*, 303–308.
- [104] Bieritz, L.-N. FÖRSTER-Energietransfer an Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotiden. Diploma Thesis. Technische Universität Braunschweig 2009.
- [105] Fachinformationszentrum Chemie GmbH, Chemgapedia. 2008; http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/dna.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/nukleinsauren/dna_strukturen/dna_doppelhelix/basenstapelung.vscml.html.
- [106] IBA, List of dyes. 4.12.2012; http://www.iba-lifesciences.com/Services_custom_oligos_custom_DNa_Fluorescent_label_List_of_dyes.html.
- [107] IBA, http://www.iba-go.de/naps/naps_p_rg_ad1.html#list. 3.02.2009.
- [108] Basu, S. *Journal of Photochemistry* **1978**, *9*, 539–544.
- [109] Zhang, B.-W.; Cao, Y.; Bai, J.-W.; Chen, J.-R. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1997**, *106*, 169–175.
- [110] Christensen, U. B.; Pedersen, E. B. *Helvetica Chimica Acta* **2003**, *86*, 2090–2097.
- [111] Christensen, U. B.; Pedersen, E. B. *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 4918–4925.
- [112] Ossipov, D.; Zamaratski, E.; Chattopadhyaya, J. *Helvetica Chimica Acta* **1999**, *82*, 2186–2200.
- [113] Kowaka, Y. et al. *Chemical Physics* **2012**, *400*, 178–184.
- [114] Baba, M. et al. *The Journal of Chemical Physics* **2009**, *131*, 224318.
- [115] Numata, Y.; Suzuki, Y.; Suzuka, I. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, *237*, 49–52.
- [116] Manoharan, M.; Tivel, K. L.; Zhao, M.; Nafisi, K.; Netzel, T. L. *The Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 17461–17472.
- [117] LI-COR Biosciences - GmbH, IRDye 800CW NHS Ester. 31.08.2013; http://www.licor.com/bio/products/reagents/irdye_800cw_nhs_ester/irdye_800cw_nhs_ester.jsp.

- [118] Cardullo, R. A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P. C.; Wolf, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 8790–8794.
- [119] Dietrich, A.; Buschmann, V.; Müller, C.; Sauer, M. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *82*, 211–231.
- [120] Clegg, R. M.; Murchie, A. I. H.; Zechel, A.; Carlberg, C.; Diekmann, S.; Lilley, D. M. J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 4846–4856.
- [121] Dolgih, E.; Roitberg, A. E.; Krause, J. L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *190*, 321–327.
- [122] Epstein, J. R.; Biran, I.; Walt, D. R. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *469*, 3–36.
- [123] Unmodifizierte DNA. 01.09.2013; http://www.biomers.net/de/Produkte/Unmodifizierte_DNA.html.
- [124] Long oligonucleotides and long-range DNA oligos, 100-200 bases. 01.09.2013; http://www.iba-lifesciences.com/custum_oligos_custom_dna_standard_100-200_bases.html.
- [125] Purimex. 01.09.2013; http://www.purimex.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=34&lang=de.
- [126] Heller, M. J.; Jablonski, E. J. (Molecular Biosystems, Inc.). Fluoreszierende STOKESsche Shift-Sonden für Polynucleotidhybridisationsproben. 01/12/1986.
- [127] Walla, P. J. Biophysical Chemistry: Script of the lecture "Biophysical Chemistry" 2006.
- [128] Olympus FluoView Resource Center: FRET Introductory Concepts. 21.06.2013; <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>.
- [129] Franke, K. Linker: Email. 27.01.2009.
- [130] Wang, L.; A. K. Gaigalas.; J. Blasic.; M. J. Holden.; D. T. Gallagher.; R. Pires, *Biopolymers* **2003**, *72*, 401–412.
- [131] TURBOMOLE V6.3 2011, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>.

-
- [132] Moore II, B.; Autschbach, J. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, *9*, 4991–5003.
- [133] Barton, D. Der zeitabhängige Formalismus zur Berechnung vibronischer Absorptionsspektren: Implementierung und Vergleich mit zustandsbasierten Methoden. M.Sc. thesis, TU Braunschweig, 2013.
- [134] Heller, E. J. *The Journal of Chemical Physics* **1978**, *68*, 2066–2075.
- [135] Cho, N.; Asher, S. A. *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 6349–6356.
- [136] Ibanez, V.; Geacintov, N. E.; Gagliano, A. G.; Brandimarte, S.; Harvey, R. G. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 5661–5666.
- [137] Bito, Y.; Shida, N.; Toru, T. *Chemical Physics Letters* **2000**, *328*, 310–315.

9 Abbildungsverzeichnis

Fig. 1.1	Übersicht verschiedener Möglichkeiten für ein Mehrfarbstoff-System	2
Fig. 1.2	Schema von <i>Up</i> - und <i>Downconversion</i>	3
Fig. 2.1	Unterschied zwischen den Potenzialkurven eines harmonischen und eines anharmonischen Oszillators	10
Fig. 2.2	FRANCK-CONDON-Prinzip des Elektronenüberganges aus dem Grundzustand	11
Fig. 2.3	JABLONSKI-Diagramm	13
Fig. 2.4	MO-Schema der Wechselwirkung zweier Monomere bei temporärer Nähe . . .	18
Fig. 2.5	Darstellung der angeregten Energieniveaus zweier Monomere und die Entstehung von Exzitonenzuständen nach Bildung eines Dimers.	20
Fig. 2.6	Darstellung der möglichen unterschiedlichen Orientierungen der Übergangsdipolmomente	21
Fig. 2.7	Die Veränderung der Absorbanzspektren nach Dimer- und Trimerbildung . . .	22
Fig. 2.8	Konzentrationsabhängige Absorptionsspektren des von Bollmann verwendeten Oxazin-Farbstoffmonomers	23
Fig. 2.9	Schematische Darstellung eines FRET anhand der Energieniveaus	27
Fig. 2.10	Visualisierung der benötigten Winkel zur Orientierungsfaktorberechnung . . .	29
Fig. 2.11	Der FÖRSTER-Abstand	30
Fig. 2.12	Schematische Darstellung des DEXTER-ET anhand der Energieniveaus	30
Fig. 2.13	Schematische Darstellung des DEXTER-ET mit Triplettzustand-Beteiligung anhand der Energieniveaus	31
Fig. 2.14	Mehrstufiger FRET	32
Fig. 2.15	Gegabelter FRET	33
Fig. 2.16	Multipler FRET	34
Fig. 2.17	Die molekulare Struktur eines DNA-Stranges	36
Fig. 2.18	Watson-Crick-Modell der DNA-Doppelhelix	38
Fig. 2.19	Die spezifische Basenpaarung der DNA	38
Fig. 2.20	Einfluss der Temperatur auf den Zustand der DNA	39
Fig. 2.21	Schematische Darstellungen der Basenstapelung	41
Fig. 3.1	Strukturformel von Pyren	44
Fig. 3.2	Probenübersicht	45

Fig. 3.3	Darstellung einer internen und 5'-Verlinkung zwischen Farbstoff und DNA . . .	50
Fig. 3.4	Orientierungsabhängige Abstände zweier Farbstoffe an den Enden einer DNA	51
Fig. 3.5	Darstellung der Winkel zueinander bei einem Abstand von 10 bp	52
Fig. 3.6	Darstellung der Winkel zueinander bei einem Abstand von 4 bp	53
Fig. 3.7	Prinzipielles Berechnungsschema	54
Fig. 4.1	Aufbau des Absorbanzspektrometers	58
Fig. 4.2	Aufbau des Fluoreszenzspektrometers	59
Fig. 5.1	Anregungswellenlängen -Test	62
Fig. 5.2	Absorbanzvergleich von von R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 in Kombination I-a . .	67
Fig. 5.3	Absorbanzvergleich von NBN , R_1NR_2 und dem errechneten Spektrum von ($NBN + R_1NR_2$) mit R_1BR_2	68
Fig. 5.4	Absorbanzvergleich von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit den errechneten Spektren (R_1NN + NNR_2) und ($BR_1 + BR_2$)	69
Fig. 5.5	Einfluss von B auf das Absorbanzverhalten von R_1 und R_2 in Kombination I-a	69
Fig. 5.6	Differenzspektren der Kombination I-a	70
Fig. 5.7	Normierte Differenzspektren der Kombination I-a	71
Fig. 5.8	Absorbanzspektren von R_1NR_2 , R_1BR_2 und ($R_1NN + NNR_2$) der Kombination II-a	72
Fig. 5.9	Vergleich der Absorbanzen von R_1NR_2 und R_1BR_2 aus Kombination II-a mit ihren dazugehörigen Summenspektren	73
Fig. 5.10	Einfluss von B auf R_1NN und NNR_2 aus Kombination II-a	73
Fig. 5.11	Differenzspektren von Kombination II-a	74
Fig. 5.12	Vergleich von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit ($R_1NN + NNR_2$) für Kombination III-a .	75
Fig. 5.13	Vergleich von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit ($R_1NN + NNR_2$) für Kombination III-a .	76
Fig. 5.14	Vergleich von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit ($R_1NN + NNR_2$) für Kombination III-a .	77
Fig. 5.15	Vergleich von R_1NR_2 und R_1BR_2 mit ($R_1NN + NNR_2$) aus Kombination 3 . .	78
Fig. 5.16	Vergleich der Absorbanzen von R_1NR_2 und R_1BR_2 aus Kombination 3 mit ihren dazugehörigen Summenspektren	78
Fig. 5.17	Einfluss von B auf R_1NN und NNR_2 aus Kombination 3	79
Fig. 5.18	Differenzspektren der Originalwerte aus Kombination 3	80
Fig. 5.19	Normierte Differenzspektren der Kombination 3	81

Fig. 5.20 Darstellung der Rohdaten-Spektren und der dazugehörigen Differenzspektren aller Kombinationen der Gruppe I	82
Fig. 5.21 Darstellung der Rohdaten-Spektren und der dazugehörigen Differenzspektren aller Kombinationen der Gruppe II	83
Fig. 5.22 Darstellung der Rohdaten-Spektren und der dazugehörigen Differenzspektren aller Kombinationen der Gruppe III	84
Fig. 5.23 Darstellung der normierten Originalspektren und der sich daraus ergebende Differenzspektren der Gruppe I	86
Fig. 5.24 Darstellung der normierten Originalspektren und der sich daraus ergebende Differenzspektren der Gruppe II	87
Fig. 5.25 Darstellung der normierten Originalspektren und der sich daraus ergebende Differenzspektren der Gruppe III	88
Fig. 5.26 Zusammenfassung der in Abbildung ?? und ?? gezeigten Peakhöhen aus den jeweiligen Differenzspektren.	89
Fig. 5.27 Darstellung der farbstoffseparierten Spektren für die Kombinationen der Gruppe I	90
Fig. 5.28 Darstellung der farbstoffseparierten Spektren für die Kombinationen der Grup- pe II	91
Fig. 5.29 Darstellung der farbstoffseparierten Spektren für die Kombinationen der Grup- pe II	92
Fig. 5.30 Zusammenfassung der in Abbildung 5.27 bis 5.29 gezeigten Peakhöhen aus den jeweiligen Differenzspektren.	93
Fig. 5.31 Darstellung der berechneten Spektren nach der Delta-Methode für Gruppe I . .	94
Fig. 5.32 Darstellung der berechneten Spektren nach der Delta-Methode für Gruppe II und III	95
Fig. 5.33 Vibronische Roh-Spektren von R, R-R, R-B und R-B-R	97
Fig. 5.34 Normierte vibronische Spektren von R, R-R, R-B und R-B-R	98
Fig. 5.35 Vibronisches Spektrum von R-B-R mit verschiedenen $R_1 \leftrightarrow B$ -Abständen . . .	99
Fig. 5.36 Vibronisches Spektrum von R_1BR_2 mit unterschiedlichen Rotationsgraden des Pyren-Moleküls	99
Fig. 5.37 Normiertes vibronisches Spektrum von R-B-R mit unterschiedlichen Rotations- graden des Pyren-Moleküls	100

Fig. 5.38 Vergleich der Absorbanzwerte von NBN, R_1BR_2 und dem Summenspektrum (NBN+ R_1NR_2) der Kombination I-a	101
Fig. 5.39 Vergleich von B und R_1BR_2 mit zwei verschiedenen Summenspektren der Kombination I-a	102
Fig. 5.40 Vergleich von NBN mit den praktischen und theoretischen BR-Spektren	103
Fig. 5.41 Verhalten der roten Farbstoffe im blauen Wellenlängenbereich	103
Fig. 5.42 Spektren von (NBN + R_1NR_2 - NNN), R_1BR_2 , ($BR_1 + BR_2$ -NBN) und (NBN + $R_1NN + NNR_2$) und daraus berechnete Differenzspektren der Kombination I-a	104
Fig. 5.43 Auf das Maximum normalisierte Spektren aus Abbildung 5.42	105
Fig. 5.44 Absorbanzspektren von NBN, R_1BR_2 und (NBN + R_1NR_2) der Kombination II-a	106
Fig. 5.45 Vergleich von NBN und R_1BR_2 der Kombination II-a mit zwei möglichen Sum- menspektren für R_1BR_2	106
Fig. 5.46 Vergleich von NBN, R_1BN , NBR_2 und den dazugehörigen Summenspektren .	107
Fig. 5.47 Verhalten der roten Farbstoffe von Kombination II-a im blauen Wellenlängen- bereich	108
Fig. 5.48 Darstellung von R_1BR_2 der Kombination II-a im Vergleich mit möglichen Sum- menspektren	108
Fig. 5.49 Auf das Maximum normierte Darstellung von R_1BR_2 der Kombination II-a im Vergleich mit möglichen Summenspektren	109
Fig. 5.50 Absorbanzverhalten von Pyren gegenüber der jeweiligen Dimere in Kombina- tion III-a	110
Fig. 5.51 Absorbanzverhalten von Pyren gegenüber R_1 und R_2 in Kombination III-a . .	111
Fig. 5.52 Darstellung der normierten Absorbanz aller Kombinationen der Gruppe I im blauen Bereich	111
Fig. 5.53 Darstellung der normierten Absorbanz aller Kombinationen der Gruppe II im blauen Bereich	112
Fig. 5.54 Darstellung der mit der „Delta-Methode“ berechneten Spektren der Kombina- tionen der Gruppe I	113
Fig. 5.55 Darstellung der mit der „Delta-Methode“ berechneten Spektren der Gruppen II und III	114

Fig. 5.56 Emissionsspektren der Kombination I-a aus von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 sowie dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$)	116
Fig. 5.57 Normierte Emissionsspektren der Kombination I-a von R_1NN , R_1BN , R_1NR_2 und R_1BR_2	116
Fig. 5.58 Normierte Emissionsspektren der Kombination I-a von NNR_2 , NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2	117
Fig. 5.59 Darstellung der wichtigsten Emissionen von Kombination I-a mit Differenzspektren	118
Fig. 5.60 Emission der Proben R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 der Kombination II-a sowie das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$)	119
Fig. 5.61 Emission von R_1NN , R_1BN , R_1NR_2 und R_1BR_2 der Kombination II-a	119
Fig. 5.62 Emission von NNR_2 , NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2 der Kombination II-a	120
Fig. 5.63 Darstellung der wichtigsten Emissionsspektren der Kombination II-a mit Differenzspektren	121
Fig. 5.64 Emission der Proben R_1NN , NNR_2 und R_1NR_2 der Kombination III-a sowie das Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$)	122
Fig. 5.65 Einfluss von Pyren auf die R-enthaltenen Proben der Kombination III-a	122
Fig. 5.66 Darstellung der wichtigsten Emissionsspektren der Kombination III-a mit Differenzspektren	123
Fig. 5.67 Emissionsspektren von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 und dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) der Kombination I-b beim R_1NN -Absorbanzmaximum	124
Fig. 5.68 Emissionsspektren von R_1NN , NNR_2 , R_1NR_2 und dem Summenspektrum ($R_1NN + NNR_2$) der Kombination I-b beim NNR_2 -Absorbanzmaximum	124
Fig. 5.69 Emissionsspektren von R_1NN , NNR_2 , R_1BN , NBR_2 , R_1NR_2 und R_1BR_2 der Kombination I-b sowie die daraus abgeleiteten Differenzspektren.	125
Fig. 5.70 Übersicht aller Kombinationen der Gruppe I	126
Fig. 5.71 Übersicht aller Kombinationen der Gruppe II	127
Fig. 5.72 Übersicht aller Kombinationen der Gruppe III	128
Fig. 5.73 Maximale Peakhöhen der roten Emissions-Differenzspektren aller drei Gruppen	129
Fig. 5.74 Darstellung der Emissionsspektren der Kombinationen aus Gruppe I nach Anregung mit 345 nm	130

Fig. 5.75 Darstellung der Emissionsspektren der Kombinationen aus Gruppe II nach Anregung mit 345 nm	131
Fig. 5.76 Darstellung der Emissionsspektren der Kombinationen aus Gruppe III nach Anregung mit 345 nm	132
Fig. 6.1 Korrelation zwischen dem Wert des Absorbanz-Schulteranstieges und Intensitätsabfall der Emission von R_1NR_2 zu R_1BR_2	142
Fig. 6.2 Nötige Niveaubeteiligung zur Bildung eines exzitonischen Trimers	144
Fig. 11.1 Pyrenabsorbanz im roten Bereich	F
Fig. 11.2 Nacktstrangabsorbanz im roten Bereich	F
Fig. 11.3 Relevante FRET-Spektren für die Kombination II-b	G
Fig. 11.4 Relevante FRET-Spektren für die Kombination II-c	H
Fig. 11.5 Relevante FRET-Spektren für die Kombination II-d	H
Fig. 11.6 Teil A der durch RightsLink vergebenen Genehmigung der Abbildung 2.7 . . .	I
Fig. 11.7 Teil B der durch RightsLink vergebenen Genehmigung der Abbildung 2.7 . . .	J
Fig. 11.8 Emailkontakt mit VOLKER ENGEL zur Genehmigung der Abbildung 2.7 . . .	K

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht der wichtigsten, in der DNA hauptsächlich vorkommenden Basen .	37
Tab. 3.1	Übersicht der verwendeten Farbstoffe R_1 und R_2	45
Tab. 3.2	Zusammensetzung aller hergestellten Kombinationen	46
Tab. 3.3	Übersicht der verwendeten Kombinationen	47
Tab. 3.4	Übersicht der Farbstoffpositionierungen	49
Tab. 3.5	Übersicht der Farbstoffpaare bezüglich Abstand r und Winkel φ	55
Tab. 5.1	Übersicht der gemessenen Absorbanzmaxima von Pyren im Vergleich von Einzel- und Dreierprobe	60
Tab. 5.2	Übersicht der gemessenen Absorbanzmaxima der verwendeten roten Farbstoffe	61
Tab. 5.3	Übersicht der Position der gemessenen Emissionsmaxima (bei Anregung im Absorbanzmaximum von NBN) von Pyren im Vergleich zwischen Einzel- und Dreierprobe	62
Tab. 5.4	Übersicht der gemessenen Positionen der Emissionsmaxima der R-Farbstoffe	63
Tab. 5.5	Kombinationsübersicht mit praktisch bestimmten Werten.	64
Tab. 5.6	Abweichung der Absorbanzwerte im Bereich der DNA-Absorption (259 nm) .	65
Tab. 6.1	Prozentuale Unterschiede zwischen Absorbanz und Fluoreszenz der Kombinationen mit geringem Abstand	139
Tab. 6.2	Übersicht der wichtigsten Ergebnisse der Absorbanz- und Emissionsmessungen	141
Tab. 11.1	Absorbanzeinstellungen	A
Tab. 11.2	Emissionseinstellungen	B
Tab. 11.3	Übersicht Strukturformeln der verwendeten Farbstoffe R_1 und R_2	C
Tab. 11.4	Übersicht der Mengen zur Einstellung der jeweiligen Konzentrationen [μ l] . .	D
Tab. 11.5	Anzahl der Messreihen und verschiedenen Konzentrationen aller Kombinationen	E

11 Anhang

11.1 Einstellungen der Messgeräte

11.1.1 Absorbanzspektrometer

Die Absorbanzspektren wurden mit den folgenden Einstellungen aufgenommen:

Tabelle 11.1: Absorbanzeinstellungen

Kombi- nation	Messreihe	Bereich / nm	Geschwindigkeit nm/min	Cycles	Lampen- wechsel /nm	Puffermessung
I-a	LB300	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 2. Probe
I-a	LB360	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 3. Probe
I-b	LB390	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 3. Probe
I-c	LB290	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 2. Probe
I-d	LB400	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 3. Probe
II-a	LB370	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 3. Probe
II-b	LB60	200 - 1000	120	1	310	in einer seperaten Messreihe
II-c	LB80	200 - 1000	120	1	310	in einer seperaten Messreihe
II-d	LB210	200 - 1100	120	1	300	nach jeder 2. Probe
II-d	WLB210	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 3. Probe
III-a bis d	LB510- 540	200 - 1000	120	1	300	nach jeder 3. Probe

11.1.2 Fluoreszenzphotospektrometer

Die Emissionsspektren wurden mit den folgenden Einstellungen aufgenommen:

Tabelle 11.2: Emissionseinstellungen

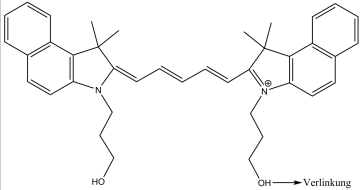
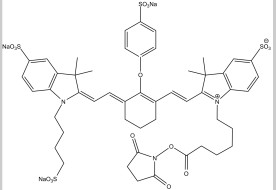
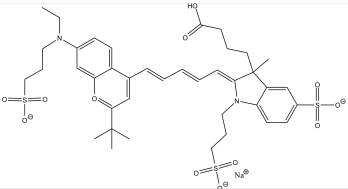
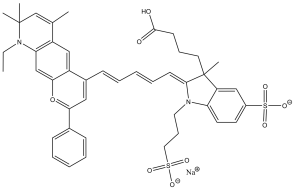
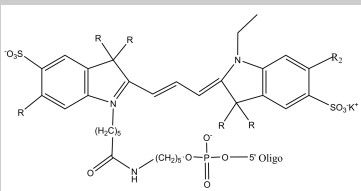
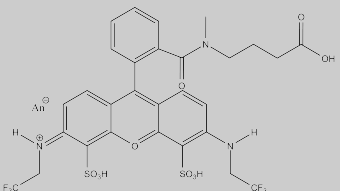
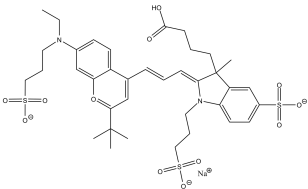
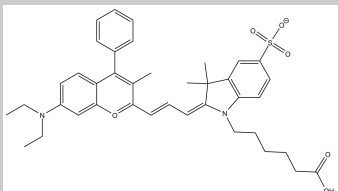
Kombination	Messreihe	Anregungswellenlängen / nm	Start- und Stoppwellenlänge / nm	Cycles
I-a	LB300	345, 686	300 - 400; 650 - 750	15
I-a	LB360	330, 345, 676	350 - 470; 660 - 780	5
I-b	LB390	330, 345, 676, 717	350 - 470; 660 - 800	5
I-c	LB290	345, 686	300 - 400; 650 - 750	15
I-d	LB400	330, 345, 630, 676	350 - 470; 620 - 780	5
II-a	LB370	330, 345, 676	350 - 470; 660 - 780	5
II-b	LB60	345, 379, 729, 794	350 - 1000; 700 - 1000	3
II-c	LB80	345; 729; 763	350 - 1000	3
II-d	LB210	345; 630, 717	360 - 420; 600 - 850	15
II-d	WLB210	330, 345, 630, 717	360 - 470; 600 - 800	5
III-a	LB510	345, 780	350 - 470; 760 - 900	10
III-b	LB520	345, 510	350 - 470; 500 - 620	10
III-c	LB530	345,, 510, 780	350 - 470; 500 - 620, 760 - 900	10
III-d	LB540	345, 510, 630	350 - 740	10

11.1.3 Kombinationen

11.1.3.1 Strukturformeln der roten Farbstoffe

Im folgenden sind die Strukturformeln der verwendeten roten Farbstoffe zu sehen.

Tabelle 11.3: Übersicht Strukturformeln der verwendeten Farbstoffe R₁ und R₂

Farbstoff	Skelettformel	Farbstoff	Skelettformel
Cy5.5		IRDye800	
Dy-732		Dy-776	
Oyster680		Atto 514	
Dy-632			
Dy-700			

Skelettformeln: IRDye800:LI-COR Biosciences;^[117] alle anderen: IBA^[106]

11.1.3.2 Konzentrationen

Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden wie folgt hergestellt:

Tabelle 11.4: Übersicht der Mengen zur Einstellung der jeweiligen Konzentrationen [μl]

Kombination	Messreihe	Probe NNN hergestellt?	Konzentration R-Farbstoffe nmol/ μl	Konzentration B nmol/ μl
I-a	LB300	-	0,0024	0,003
I-a	LB360	X	0,0012; 0,0024	0,0015; 0,003
I-b	LB390	X	0,0012	0,0015
I-c	LB290	-	0,0024	0,003
I-d	LB400	X	0,0012	0,0015
II-a	LB370	X	0,0012*; 0,0024	0,0015; 0,003
II-b	LB60	-	0,001; 0,002; 0,0036	0,001; 0,002; 0,0036
II-c	LB80	-	0,001; 0,002	0,001; 0,002
II-d	LB210	-	0,0016	0,002
II-d	WLB210	-	0,0016	0,002
III-a bis d	LB510 bis 540	X	0,0012; 0,0024	0,0015; 0,003

Als weitere Information wird in Tabelle 11.5 gezeigt, in wie vielen Messreihen und Konzentrationen die jeweilige Kombination hergestellt wurde.

11.2 Zusätzliche Spektren und Informationen

In diesem Kapitel werden die Spektren gezeigt, die interessante Informationen zu Nebenbedingungen des Effektes beinhalten, aber im Hauptteil den inhaltlichen Fluss unterbrochen hätten.

11.2.1 Absorbanzspektren

Bei der Addition der einzelnen Spektren im roten Wellenlängenbereich wurde festgestellt, dass sowohl die einzelnen DNA-Stränge als auch der blaue Farbstoff in diesem Wellenlängenbereich nicht absorbieren. Um dies zu überprüfen wurden die NBN-Spektren aller Kombinationen nach dem Pufferabzug bei 750 nm auf Null gesetzt und anschließend gemittelt (siehe Abbildung 11.1).

Ebenso wurde mit den Nacktstrangproben verfahren. Das gemittelte Spektrum aus allen NNN-Proben ist in Abbildung 11.2 dargestellt.

Tabelle 11.5: Anzahl der Messreihen und verschiedenen Konzentrationen aller Kombinationen

Kombinations- nummer (#)	R ₁	R ₂	hergestellt für
I-a	Cy5.5	Cy5.5	drei Messreihen, zwei Konzen- trationen
I-b	Cy5.5	Dy-700	eine Konzentration
I-c	Oyster 680	Oyster 680	zwei Messreihen
I-d	Dy-632	Cy5.5	eine Konzentration
II-a	Cy5.5	Cy5.5	zwei Konzen- trationen
II-b	Dy-732	IRDye800	drei Konzen- trationen
II-c	Dy-732	Dy-776	zwei Konzen- trationen
II-d	Dy-632	Dy-700	zwei Messreihen
III-a	Alexa Fluor 790	Alexa Fluor 790	zwei Konzen- trationen
III-b	Atto 514	Atto 514	zwei Konzen- trationen
III-c	Atto 514	Alexa Fluor 790	eine Konzentration
III-d	Atto 514	Dy632	zwei Konzen- trationen

11.2.2 Zusätzliche Informationen zur Erstellung der theoretisch errechneten Spektren

Die grundlegende Näherung, auf der die TDO-Methode beruht, ist das "Independent Mode Displaced Harmonic Oscillator"(IMDHO)-Modell. Hierbei wird angenommen, dass die Potentialhyperflächen im Grund- und angeregten Zustand durch identische harmonische Potentiale ausgedrückt werden können. Die Unterscheidung erfolgt sowohl durch einen horizontalen *Shift*, das sogenannte ΔJ und einem vertikalen *Shift*, der der Anregungsenergie entspricht. Da die Normalmoden identisch sein müssen, muss lediglich eine Frequenzanalyse des Grundzustandes gemacht werden, nicht aber des angeregten Zustandes. Zur Berechnung von ΔJ werden

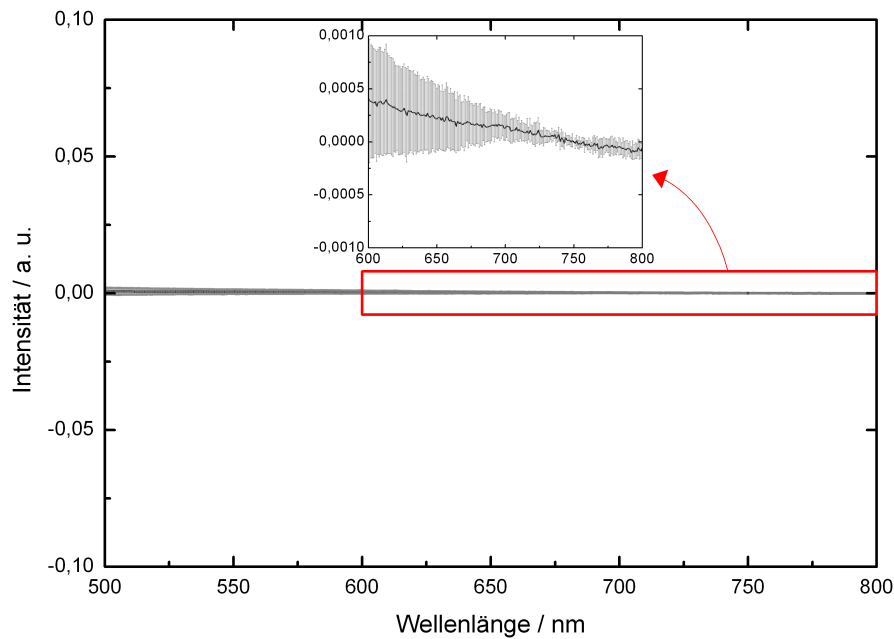


Abbildung 11.1: Pyrenabsorbanz im roten Bereich aller Kombinationen. Es ist erkennbar, dass die Absorbanz in diesem Bereich vernachlässigbar klein ist.

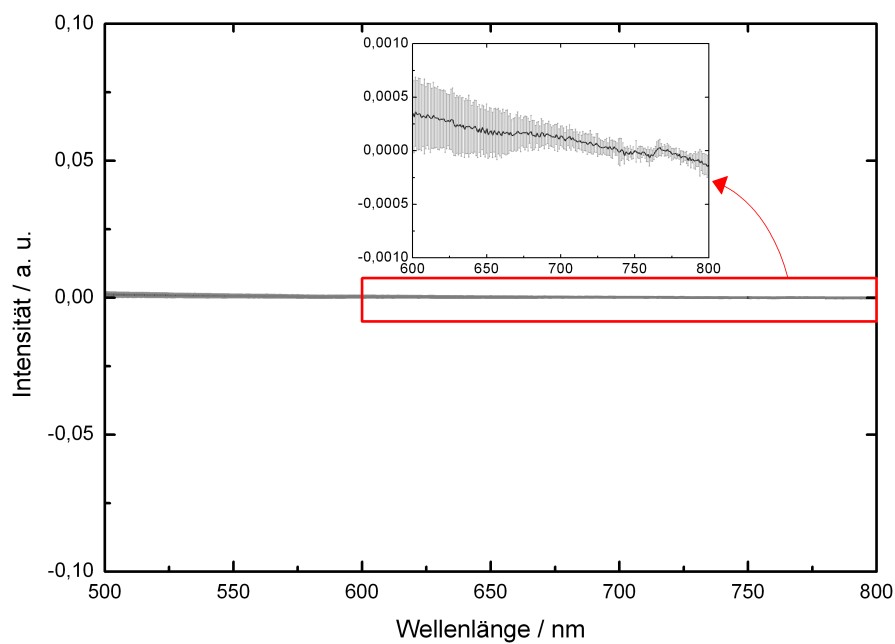


Abbildung 11.2: Nacktstrangabsorbanz im roten Bereich. Es ist erkennbar, dass die Absorbanz in diesem Bereich ähnlich zu Pyren verläuft und ebenfalls vernachlässigt werden kann. Zur Berechnung herangezogen wurden die Nacktstrang-Absorbanzwerte aller Kombinationen.

sämtliche Normalmoden des Systems benötigt. Zudem bedarf es des Gradienten des angeregten Zustandes sowie die Anregungsenergie, die bei einer Bestimmung des Gradienten allerdings bereits mitberechnet wird.

11.2.3 FRET-Messungen zwischen R_1 und R_2

An dieser Stelle werden nur die hinsichtlich eines FRET zwischen R_1 und R_2 relevanten Spektren der Kombinationen II-b, II-c und II-d gezeigt. Eine Berechnung der Transfereffizienz oder ähnliches wurde nicht durchgeführt, da es rein qualitativ interessant ist, dass ein FRET stattgefunden hat. Für die rein spektrale Betrachtung wurde stets zunächst ein fiktives R_1^* -Spektrum erstellt, indem das ursprüngliche R_1 NN-Spektrum auf den Wert innerhalb der R_1 NR₂, bzw. R_1 BR₂-Probe normiert wurde. Dieses fiktive R_1^* -Spektrum wurde anschließend zum R_2 -Spektrum, das bei der R_1 -Wellenlänge angeregt wurde, hinzuaddiert. Liegt das tatsächlich gemessene R_1 NR₂- und/oder R_1 BR₂-Spektrum über diesem Summationsspektrum, so kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass ein FRET stattgefunden hat.

Nacheinander werden nun die Gesamtspektren für Kombination II-b (Abbildung 11.3), Kombination II-c (Abbildung 11.4) und Kombination II-d (Abbildung 11.5) dargestellt.

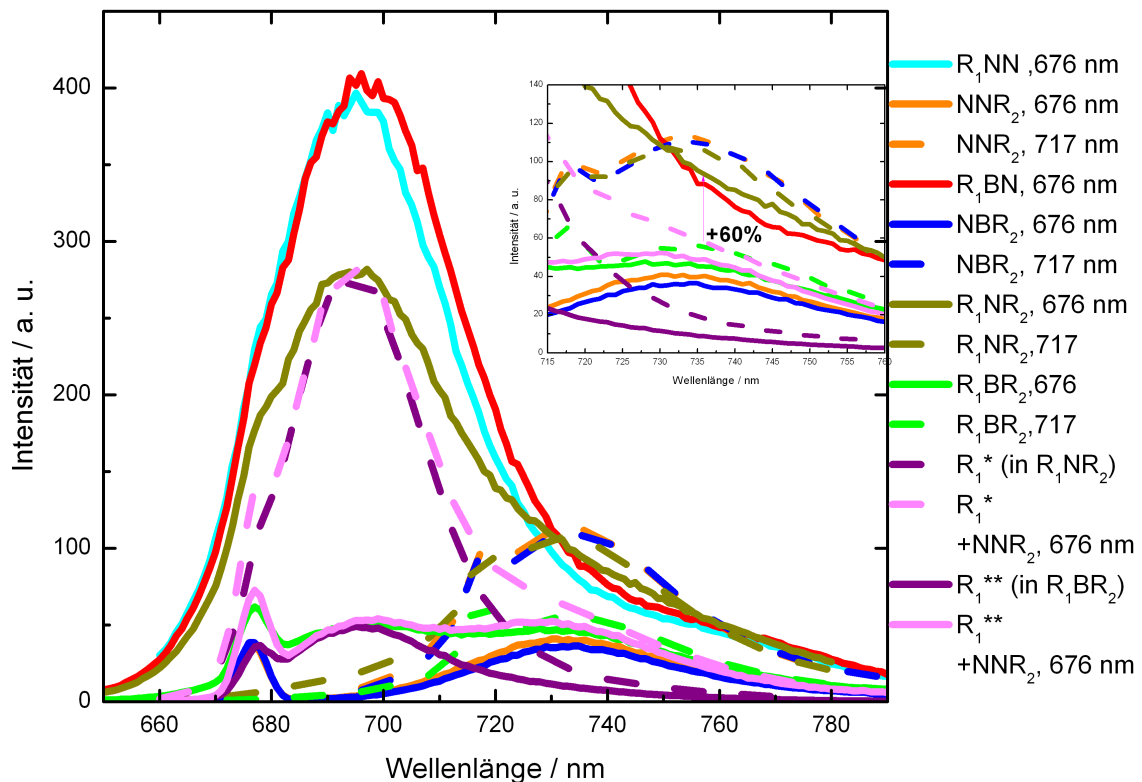


Abbildung 11.3: Relevante FRET-Spektren für die Kombination II-b

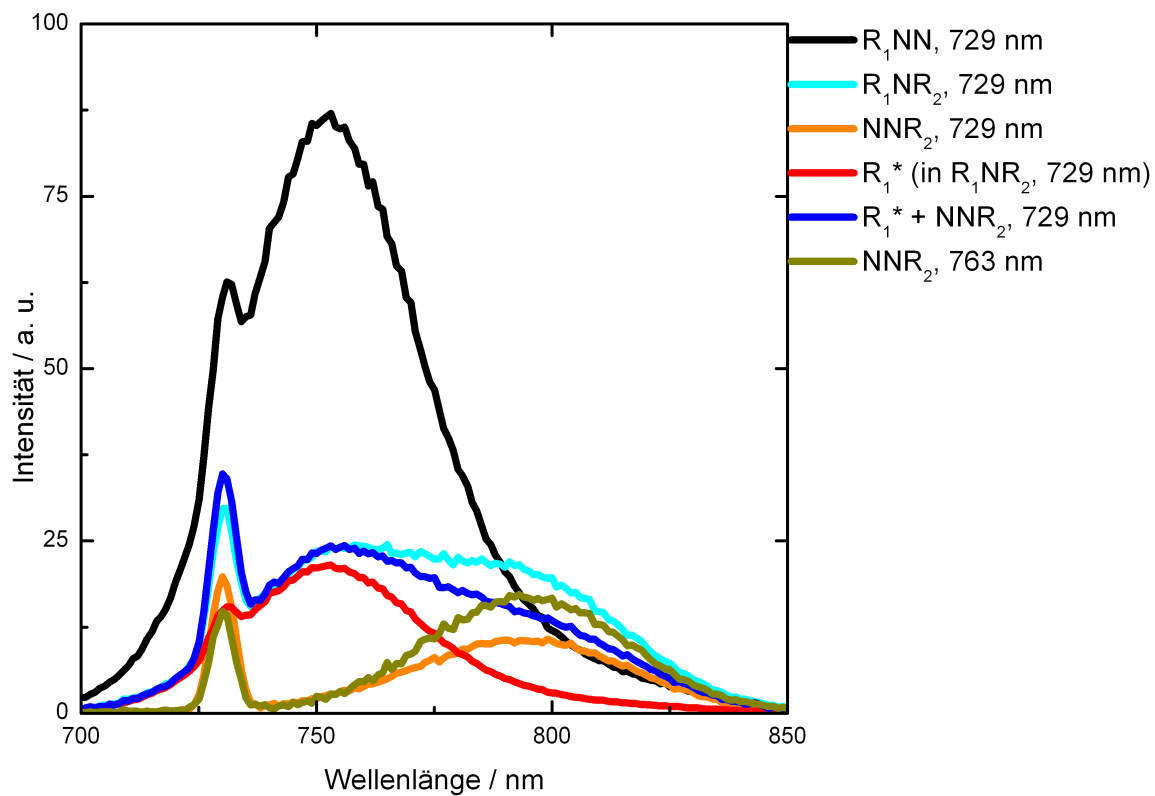


Abbildung 11.4: Relevante FRET-Spektren für die Kombination II-c

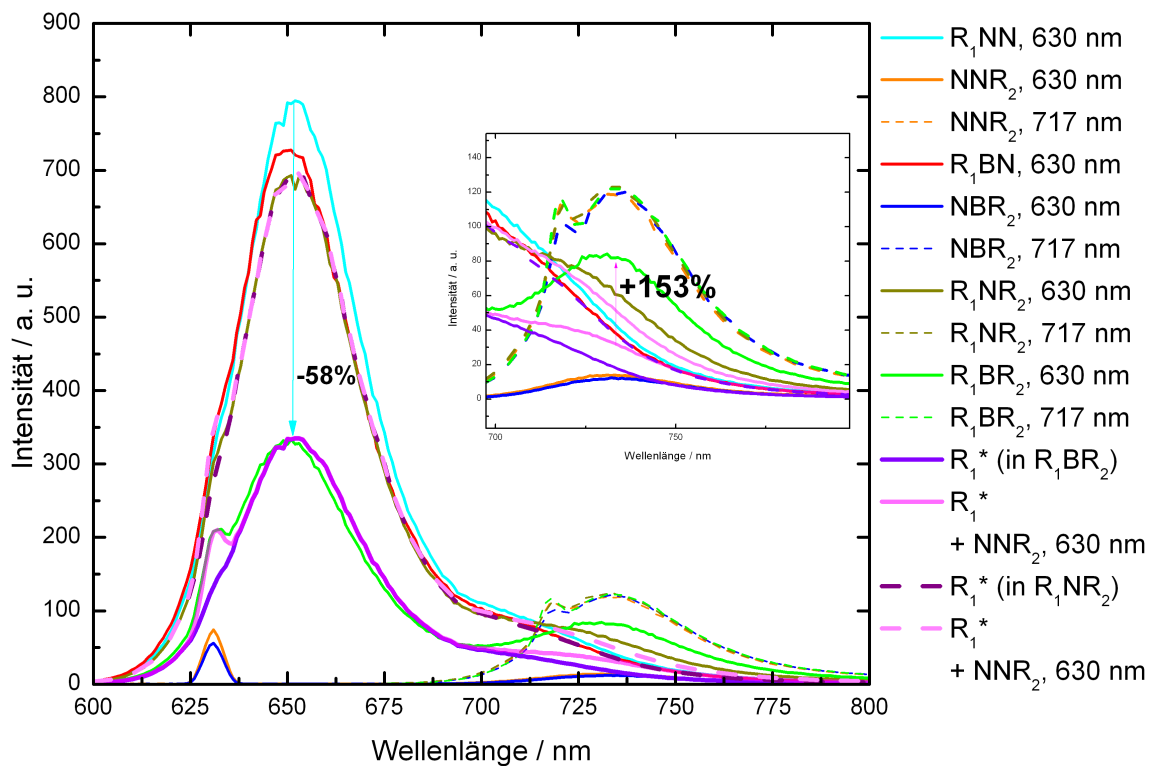


Abbildung 11.5: Relevante FRET-Spektren für die Kombination II-d

11.3 Genehmigungen

Nachfolgend sind in den Abbildungen 11.6 bis 11.8 die Genehmigungen zur Verwendung der Abbildung 2.7 (Seite 22) zu finden.

**AIP PUBLISHING LLC LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Dec 07, 2013

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3206640184569
Order Date	Aug 12, 2013
Publisher	AIP Publishing LLC
Publication	Journal of Chemical Physics
Article Title	Absorption spectroscopy of molecular trimers
Author	Joachim Seibt, Volker Dehm, Frank Würthner, Volker Engel et al.
Online Publication Date	Apr 25, 2007
Volume number	126
Issue number	16
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Author (original article)
Format	Print and electronic
Portion	Figure/Table
Number of figures/tables	1
Title of your thesis / dissertation	Nachweis konzentrierter elektronischer Kopplungen in Dreifarbstoffsystemen
Expected completion date	Oct 2013
Estimated size (number of pages)	150
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

AIP Publishing LLC -- Terms and Conditions: Permissions Uses

AIP Publishing LLC ("AIPP") hereby grants to you the non-exclusive right and license to use and/or distribute the Material according to the use specified in your order, on a one-time basis, for the specified term, with a maximum distribution equal to the number that you have ordered. Any links or other content accompanying the Material are not the subject of this license.

1. You agree to include the following copyright and permission notice with the reproduction of the Material: "Reprinted with permission from [FULL CITATION]. Copyright [PUBLICATION YEAR], AIP Publishing LLC." For an article, the copyright and permission notice must be printed on the first page of the article or book chapter. For photographs, covers, or tables, the copyright and permission notice may appear with the Material, in a footnote, or in the reference list.
2. If you have licensed reuse of a figure, photograph, cover, or table, it is your responsibility to ensure that the material is original to AIPP and does not contain the copyright of another entity, and that the copyright notice of the figure, photograph, cover, or table does not indicate that it was reprinted by AIPP, with permission, from another source. Under no circumstances does AIPP, purport or intend to grant permission to reuse material to which it does not hold copyright.
3. You may not alter or modify the Material in any manner. You may translate the Material into another language only if you have licensed translation rights. You may not use the Material for promotional purposes. AIPP reserves all rights not specifically granted herein.
4. The foregoing license shall not take effect unless and until AIPP or its agent, Copyright Clearance Center, receives the Payment in accordance with Copyright Clearance Center Billing and Payment Terms and Conditions, which are incorporated herein by

Abbildung 11.6: Teil A der durch RightsLink vergebenen Genehmigung zur Verwendung der Abbildung 2.7

reproduction of the Material: "Reprinted with permission from [FULL CITATION]. Copyright [PUBLICATION YEAR], AIP Publishing LLC." For an article, the copyright and permission notice must be printed on the first page of the article or book chapter. For photographs, covers, or tables, the copyright and permission notice may appear with the Material, in a footnote, or in the reference list.

2. If you have licensed reuse of a figure, photograph, cover, or table, it is your responsibility to ensure that the material is original to AIPP and does not contain the copyright of another entity, and that the copyright notice of the figure, photograph, cover, or table does not indicate that it was reprinted by AIPP, with permission, from another source. Under no circumstances does AIPP, purport or intend to grant permission to reuse material to which it does not hold copyright.
3. You may not alter or modify the Material in any manner. You may translate the Material into another language only if you have licensed translation rights. You may not use the Material for promotional purposes. AIPP reserves all rights not specifically granted herein.
4. The foregoing license shall not take effect unless and until AIPP or its agent, Copyright Clearance Center, receives the Payment in accordance with Copyright Clearance Center Billing and Payment Terms and Conditions, which are incorporated herein by reference.
5. AIPP or the Copyright Clearance Center may, within two business days of granting this license, revoke the license for any reason whatsoever, with a full refund payable to you. Should you violate the terms of this license at any time, AIPP, AIP Publishing LLC, or Copyright Clearance Center may revoke the license with no refund to you. Notice of such revocation will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not nullify the revocation.
6. AIPP makes no representations or warranties with respect to the Material. You agree to indemnify and hold harmless AIPP, AIP Publishing LLC, and their officers, directors, employees or agents from and against any and all claims arising out of your use of the Material other than as specifically authorized herein.
7. The permission granted herein is personal to you and is not transferable or assignable without the prior written permission of AIPP. This license may not be amended except in a writing signed by the party to be charged.
8. If purchase orders, acknowledgments or check endorsements are issued on any forms containing terms and conditions which are inconsistent with these provisions, such inconsistent terms and conditions shall be of no force and effect. This document, including the CCC Billing and Payment Terms and Conditions, shall be the entire agreement between the parties relating to the subject matter hereof.

This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York. Both parties hereby submit to the jurisdiction of the courts of New York County for purposes of resolving any disputes that may arise hereunder.

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501088518.

Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.

Abbildung 11.7: Teil B der durch RightsLink vergebenen Genehmigung zur Verwendung der Abbildung 2.7

Re: Genehmigung der Weiterverwendung einer Abbildung

Voller Engel 19.07.2013 09

Hallo,

grünes Licht: Sie können die Abbildung gern verwenden.

Ich meine aber, eigentlich hat das AIP das copyright, sodass wir da eh nichts zu sagen haben.

MfG

V. Engel

Sehr geehrter Prof. Dr. Engel,

mein Name ist Larissa-Natalie Bieritz und ich promoviere an der TU Braunschweig im Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Hans-Sommer-Straße 10, 38106 Braunschweig.

Für meine Dissertation würde ich gerne eine Ihrer publizierten Abbildungen verwenden, weshalb ich mich laut der AIP/The Journal of Chemical Physics direkt an Sie wenden soll.

Bei der Abbildung handelt es sich um

Figure 5,
Seite 164308-5
Seibt, Joachim; Dehm, Volker; Würthner, Frank; Engel, Volker
"Absorption spectroscopy of molecular trimers"
J. Chem. Phys. 126, 164308 (2007)
(doi: 10.1063/1.2721540)

Meine Dissertation trägt den (noch Arbeits-)Titel "EVIDENCE FOR BIFURCATED ELECTRONIC COUPLINGS IN THREE CHROMOPHORE SYSTEMS" und wird durch die Universitätsbibliothek Braunschweig veröffentlicht. Die Veröffentlichung wird nicht-kommerziell sein und maximal 15 Kopien beinhalten.

Es wäre schön, wenn Sie mir mitteilen könnten, ob und wie Sie der Nutzung zustimmen. Ansonsten werde ich die Abbildung nicht verwenden.

Mit freundlichen Grüßen

Larissa-N. Bieritz

--
Prof. V. Engel
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Universität Würzburg
TC, Am Hubland
Email-Fischer-Str. 42
97074 Würzburg
Tel.: +49-931-31-86376
Fax.: +49-931-31-85331
E-mail: voen8phys-chemie.uni-wuerzburg.de
http://www.phys-chemie.uni-wuerzburg.de/arbeitsgruppen/ak_prof_v_engel/

Abbildung 11.8: EMailkontakt mit VOLKER ENGEL für die Genehmigung zur Verwendung der Abbildung 2.7

12 Danksagung

Nach all der Zeit mit ihren Höhen und Tiefen bin ich sehr stolz, meine Arbeit zu diesem Ergebnis gebracht zu haben. FRET war nicht immer so da, wie ich mir das von ihm gewünscht hätte. Doch ich habe immer an ihn geglaubt und er hat letztendlich einen Teil zurückgegeben - daher gilt ihm mein Dank zuerst.

Weiterhin möchte ich mich bei folgenden realen Personen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet und unterstützt haben:

- ... Prof. Dr. Peter Jomo Walla für das spannende Thema sowie die Unterstützung, es auch bis zum Abschluss bringen zu können.
- ... Prof. Dr. Johannes Neugebauer und Albrecht Goetz für die fruchtbare Kooperation mit ihren neuen Erkenntnissen und Denkansätzen. Besonders Albrecht möchte ich noch einmal danken, mit mir meine vielen Fragen zu den Feinheiten der Theoretischen Chemie diskutiert zu haben.
- ... meinen lieben Bürokollegen Christoph-P. Holleboom, Laura S. van den Heuvel und Nour M. Hafi für eine tolle Arbeitsatmosphäre im allgemeinen und die Korrekturen, fachlichen Gesprächen und mentale Unterstützung zu Gunsten dieser Arbeit im speziellen. Christoph möchte ich dabei besonders für eine lange, unkomplizierte und sehr angenehme Schreibtschnachbarschaft danken (inklusive der Hintergrundmusik-, Tacker-, Ohrwurm-, Wasser- und Anthropomorphismenthemen)
- ... Sabrina Schröder und Matthias Grunwald aus dem Göttinger Teil unserer Arbeitsgruppe für das Erstellen und Diskutieren über schwierige Gele und das Messen von widerspenstigem Pyren.
- ... allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Walla und des Institutes, die mir die Zeit hier durch viele Gesprächsthemen und Unternehmungen verschönert haben (in alphabetischer Reihenfolge): Stefan Bode, Jian-Hua Chen, Daniel Gacek, Wensi Gao, Michael Gauß, Birgit Gerke, Julia Hoffmann, Iman Kattan, Pen-Nan Liao, Chao-Chen Lin, Julia Lüttich, Dominik Pfennig, Alexander Pieper, Inga Schack, Jan Voigt, Kai Welke, Viktor Werwein und Tino Wolter. Zusätzlich all den Massen von Studienarbeitern, die einem so manche Messung abgenommen haben.

- ... Jan S. Frähmcke für das immer wieder geliehene Ohr und Auge sowie für die Annahme kniffliger L^AT_EX-Herausforderungen.
- ... Dr. Tomáš Kubař für die spannenden Diskussionen über DNA und ihre möglichen Bindungsvorlieben sowie für die Grafik-Erstellung derselbigen.
- ... Julia Geiger und Hannah Linck, die mich mit ihrer Freundschaft nicht nur seit Jahren aus jedem Tief geholt haben und jedes Hoch noch schöner gemacht haben, sondern sich mir zuliebe in die Welt der Molekularbiologie vorgewagt haben, um meine Wünsche nach besonderen DNA-Darstellungen nachvollziehen zu können.

Gerade während in den letzten Jahren musste ich mich nie entscheiden, ob ich Doktorin oder Weltmeisterin werden möchte. Ich habe beides geschafft - Dank meines Vaters Axel, der immer hinter mir stand und mich unterstützt hat und meines Freundes Tobias Graumann - ohne ihn wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Und vor allem nicht, was ich heute bin.